

**Die cytosolische Ca^{2+} - Konzentration
in Pankreasinseln als Vermittler der insulinotropen
Wirkung von Glucose-selektiven und nicht Glucose-
selektiven Stimuli**

Der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Antje Wienbergen
aus
Hoya/Weser

1. Referent:	Prof. Dr. med. I. Rustenbeck
2. Referent:	Prof. Dr. med. U. Panten
eingereicht am:	28.08.2006
mündliche Prüfung (Disputation) am:	18.12.2006
Druckjahr:	2007

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

REMIZOV O, JAKUBOV R, DÜFER M, KRIPPEIT DREWS P, DREWS G, WARING M, BRABANT G, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I, SCHÖFL C (2003): Palmitate-induced Ca^{2+} -signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol* 212:1-9.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2004): Glucose dependence of imidazoline - induced insulin secretion, different characterisation of two ATP-sensitive K^{+} channel-blocking compounds. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S135-S139.

RUSTENBECK I, WIENBERGEN A, BLECK C, JÖRNS A (2004): Desensitization of insulin secretion by depolarizing insulin secretagogues. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S140-S150.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2005): Essential role of the imidazoline moiety in the insulintropic effect but not the K_{ATP} channel-blocking effect of imidazolines; a comparison of the effects of efaroxan and its imidazol analogue, KU14R. *Diabetologia* 48: 2567-2575.

WIENBERGEN A, BLECK C, GROSSE LACKMANN T, RUSTENBECK I (2006): Antagonism of the insulintropic action of first generation imidazolines by openers of K_{ATP} channels. *Biochem Pharmacol*, in Revision.

Tagungsbeiträge:

WIENBERGEN A, FRICKE K, DICKEL C, GROSSE LACKMANN T, RUSTENBECK I: Antagonism of the insulintropic effect of imidazolines by K_{ATP} -channel-openers; Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2003); Vol. 367, Suppl. 1; R75; 285, 44. Frühjahrstagung der

Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I: Efaroxan, but not RX871024 is a glucose-selective insulinotropic imidazoline; Diabetes Metab (2003), 29, 4S79, 1595. 18. Kongress der Internationalen Diabetes Federation in Paris.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: Induction of oscillations of the cytosolic calcium concentration in pancreatic islets by the imidazoline efaroxan but not by RX871024. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2004); Vol. 369, Suppl. 1; R71; 283, 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I: Is the imidazoline moiety necessary for the insulinotropic effect of imidazolines ? Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2004); Vol. 369, Suppl. 1; R72; 285, 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie in Mainz.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: Relation between glucose dependent stimulation of insulin secretion and oscillations of the cytosolic calcium concentration in mouse pancreatic islets. Diabetes und Stoffwechsel 13 (2004), 123, P-268.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: The imidazoline efaroxan acts as enhancer of nutrient-induced insulin secretion. Diabetologia (2004), Vol. 47, Suppl. 1, A155, 418, 39. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in München.

BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I: The role of the imidazoline moiety for the insulinotropic effect of imidazolines. Diabetologia (2004), Vol. 47, Suppl. 1, A155, 417, 39. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in München.

WIENBERGEN A, BLECK C, RUSTENBECK I: The glucose selective insulinotropic effect of efaroxan. Diabetologia (2005), Vol. 48, Suppl.1, A167, 450, 40. Jahrestagung der European Association for the Study of Diabetes in Athen.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2002 bis Februar 2006 am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig angefertigt.

Herrn Prof. Dr. med. Ingo Rustenbeck danke ich herzlich für die interessante Themenstellung und für die stets freundliche und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt dabei Verena Lier-Glaubitz für die Einführung und geduldige Unterstützung bei den Messungen zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, Frau G. Wittenberg für die Einführung in die Pankreasinselisolierung und für die Gestaltung des Cytologie-Kurses, Petra Weber für die Unterstützung bei der Insulinsekretionsmessung und den Mitarbeiterinnen der Zentralen Einrichtung der Tierhaltung für die ausgezeichnete Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus - Definition und Bedeutung	1
1.2	Die Regulation der Insulinsekretion aus den B-Zellen in Langerhans'schen Inseln der Maus	3
1.3	Etablierte Therapiemöglichkeiten beim Typ 2 Diabetes	9
1.4	Glucose-selektive insulinotrope Pharmaka: GLP-1-Analoga und Imidazoline	10
2	Ziele der Arbeit	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Isolierung von Langerhans'schen aus dem Pankreas von NMRI-Mäusen und deren Kultivierung	17
3.1.1	Basismedium für die Isolierung von Pankreasinseln und die Perifusion	17
3.1.2	Stammmedien und Testmedien	19
3.1.3	Kontrollmedien	22
3.1.4	Stamm- und Inkubationsmedien der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	23
3.1.5	Kulturmedien für die Pankreasinselisolierung	23
3.1.5.1	RPMI-Medien für die Zellkultur	23
3.1.6	Collagenlösung zur Beschichtung von Deckgläschen	24
3.1.7	Versuchstiere	24
3.1.8	Gewebebegewinnung und Zellkultur	25
3.1.8.1	Pankreasinselisolierung	25
3.1.8.2	Kultivierung isolierter Langerhans'scher Insel der Maus	27
3.2	Insulinsekretionsmessung	28
3.2.1	Perifusion isolierter Langerhans'scher Inseln der Maus	28
3.2.2	Bestimmung des Insulingehalts	30
3.2.3	Datenauswertung	30
3.3	Mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus	31
3.3.1	Aufbau der Messvorrichtung	31
3.3.2	Fluoreszenz ionensensitiver Farbstoffe	34
3.3.2.1	Der Fluoreszenzindikator Fura-2	34
3.3.2.2	Der Fluoreszenzindikator Fura-PE3	36
3.3.2.3	Der Fluoreszenzindikator Fluo-3	37

Inhaltsverzeichnis

3.3.2.4	Die Beladung der Pankreasinseln mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen	37
3.3.2.5	Kalibrierung	39
3.4	Mikrofluorimetrische Messung der NAD(P)H-Konzentration in B-Zellen von Pankreasinseln der Maus	40
3.5	Praktische Durchführung der Fluoreszenzmessungen	42
3.5.1	Datenauswertung	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Etablierung der Perfusion von Pankreasinseln der Maus zum Zwecke der Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration	45
4.1.1	Zur Rolle der ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, Fura-PE3 und Fluo-3 als Indikatoren in Langerhans'schen Inseln der Maus	45
4.1.1.1	Die Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2	45
4.1.1.2	Die Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-PE3	54
4.1.1.3	Zur Rolle von Fluo-3 als ionensensitiver Fluoreszenzindikator eingesetzt im 1 λ -Verfahren	56
4.2	Mechanismus der Imidazolin-induzierten Insulinsekretion	57
4.2.1	Antagonismus der insulinotropen Wirkung der Imidazoline Alindin, Idazoxan, Phentolamin und Efaroxan durch Diazoxid	57
4.2.2	Grundlegende Charakterisierung des Imidazolineffektes auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus	61
4.2.2.1	Konzentrationsabhängigkeit der Efaroxan-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10mM) Glucosekonzentration in Pankreasinseln der Maus	61
4.2.2.2	Der Effekt von 100 μM Efaroxan auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus in Gegenwart von α -Ketoisocapronsäure	69
4.2.2.3	Die Phentolamin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration in Pankreasinseln der Maus	71
4.2.2.4	Die Alinidin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration in Pankreasinseln der Maus	73

Inhaltsverzeichnis

4.2.2.5	Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus durch das Imidazolin RX871024 in Anwesenheit von basaler (5 mM) und stimulatorisch wirkender (10 mM) Glucosekonzentration	75
4.2.2.6	Vergleichende Charakterisierung der Wirkung von Tolbutamid und 40 mM K^{+} auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in isolierten Langerhans'schen Inseln der Maus	79
4.2.2.7	Interaktionen von Efaroxan mit Tolbutamid und 40 mM Kaliumchlorid bezüglich des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals in isolierten Pankreasinseln	84
4.2.2.8	Das Imidazolin Efaroxan und sein Imidazol-Analogon KU14R: Dokumentation von KU14R-induzierten Effekten auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus im Vergleich mit Efaroxan	89
4.2.3	Modifizierung der NAD(P)H-Konzentration in Pankreasinseln der Maus durch das Imidazolin Efaroxan	97
4.2.3.1	Detektion von NAD(P)H-Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe des 1λ-Epifluoreszenzmikroskops	97
4.2.3.2	Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Gegenwart unterschiedlicher Glucosekonzentrationen bei Raumtemperatur in Pankreasinseln der Maus	98
4.2.3.3	Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Langerhans'schen Inseln der Maus in Gegenwart von Glucose	100
4.2.3.4	Bestimmung des NAD(P)H-Pools in der Pankreasinsel der Maus durch Exposition mit Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und Oligomycin	102
4.2.3.5	Bestimmung der NADP(H)-Fluoreszenzintensität in Langerhans'schen Inseln der Maus in Gegenwart von Glucose und 100 µM Efaroxan bei 37°C	104
4.3	Die Wirkung von freien Fettsäuren auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung	106
4.3.1	Die Wirkung der Palmitinsäure auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus	106
4.3.1.1	Einfluss von 2-Bromopalmitinsäure auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion in Gegenwart von Palmitat	107
4.3.1.2	Der Efaroxan-induzierte Effekt auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose und 100 µM Palmitinsäure	108

Inhaltsverzeichnis

4.3.2	Wirkung von Palmitat und 2-Bromopalmitat auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus	109
4.3.3	Untersuchung des Effektes zweier langkettiger Fettsäuren auf den NAD(P)H-Pool in der Pankreasinsel der Maus in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration (10 mM) bei Raumtemperatur	113
5	Diskussion	117
5.1	Methodische Betrachtungen zur Verwendung von intakten Pankreasinseln in der Messung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalen in B-Zellen	117
5.1.1	Massnahmen zur Eindämmung der Beeinträchtigung der funktionellen Integrität der Pankreasinseln der Maus durch Kultivierungsbedingungen	118
5.1.2	Der mögliche Beitrag von Nicht-B-Zellen zum Fura-Signal in intakten Pankreasinseln	120
5.2	Untersuchung zum Antagonismus der insulinotropen Wirkung von Imidazolinen durch den K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid	121
5.3	Bedeutung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration für den insulinotropen Effekt von Imidazolinen	122
5.3.1	Die unterschiedliche Glucoseselektivität der insulinotropen Wirkung der vier Imidazoline Efaroxan, Alinidin, RX871024 und Phentolamin	125
5.3.2	Ist die Glucoseselektivität des insulinotropen Effektes von Efaroxan Teil einer Selektivität für sekretionsauslösende Nährstoffe ?	128
5.3.3	Über welche Mechanismen ist der Efaroxan-induzierte Effekt in Gegenwart substimulatorischer Glucosekonzentration (5 mM) zu begründen ?	130
5.4	Das Imidazolin Efaroxan und dessen Imidazol-Analogon KU14R: Unterschiede und Gemeinsamkeiten	134
5.5	Sind mikromolaren Konzentrationen freier Fettsäuren Stimuli der Insulinsekretion mit Nährstoffcharakter („fuel secretagogues“) ?	136
6	Zusammenfassung	139
7	Literatur	143
8	Abkürzungen	159

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus - Definition und Bedeutung

Der Diabetes mellitus, auch „Zuckerkrankheit“ genannt, stellt eine komplexe Regulationsstörung des Stoffwechsels dar. Kennzeichen dieser Stoffwechselstörung ist eine pathologisch erhöhte Glucosekonzentration (Hyperglykämie), häufig begleitet von einer chronischen Hyperlipidämie, Adipositas und Hypertonie. Ein Diabetes mellitus liegt nach Kriterien der American Diabetes Association (ADA) vor, wenn die venöse Plasmaglukosekonzentration beim nüchternen Menschen über 126 mg/dl (7,0 mmol/l) ansteigt oder wenn 2 Stunden nach einer oralen Glucosebelastung (75 g Glucose) im Kapillarblut mehr als 11,0 mmol/l Glucose oder mehr als 200 mg/ml gefunden werden (ADA Expert Committee, 2003).

In Deutschland sind ca. 7 - 8 % der Bevölkerung an Diabetes mellitus erkrankt (Hauner, 1998; Janka et al., 2000), wobei ca. 5 % dieser Patienten an dem Typ 1 Diabetes leiden (Janka et al., 2000; s. auch Tabelle 1.1.) und ca. 80 - 90 % dieser Patienten an dem Typ 2 Diabetes.

Der Typ 1 Diabetes ist nach gegenwärtiger Auffassung immunologisch vermittelt, es kommt zur Zerstörung der Insulin-produzierenden B-Zellen des Pankreas und zu einem absoluten Insulinmangel (Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft DDG, 2002).

Der Typ 2 Diabetes stellt heutzutage die häufigste Diabetesform dar, wobei aufgrund biopsychosozialer Faktoren wie Überernährung, Übergewicht, körperliche Inaktivität und Stress eine weltweite Zunahme der Prävalenz für Diabetes zu beobachten ist. Im Jahre 2000 waren insgesamt 151 Millionen Menschen am Typ 2 Diabetes erkrankt und Schätzungen lassen annehmen, dass diese Zahl bis zum Jahre 2025 auf 300 Millionen ansteigt (Zimmet et al., 2001). Häufig zeigen Typ 2 Diabetiker eine verminderte Ansprechbarkeit des Gewebes auf Insulin. Diese Insulinunterempfindlichkeit des peripheren Gewebes oder Insulinresistenz (Boden, 1997) kann durch Übergewicht (Saltiel, 2001) und/oder einer chronischen Hyperlipidämie ausgelöst werden. Ursache dieser Insulinresistenz ist eine durch dauerhafte Erhöhung der Blutglukosekonzentration induzierte Down-Regulation der Insulinrezeptoren in der Plasmamembran der Zielzellen. Folge ist eine Glucoseintoleranz (Prädiabetes), d.h. die Unfähigkeit des Organismus, resorbierte Glucose aus dem Blut in Fett- und Muskelzellen zu transportieren. Im Anfangsstadium der Erkrankung kommt es dann zu einer Hyperinsulinämie. Einen manifesten Diabetes entwickeln dann diejenigen Patienten, bei denen die

Einleitung

gesteigerte Insulinsekretion nicht ausreichend ist, die Insulinresistenz zu kompensieren (Cahill, 1988; Ferannini, 1998; Gerich, 1998).

1. Typ 1 Diabetes
immunologisch vermittelte B-Zellstörung mit der Folge eines absoluten Insulinmangels
2. Typ 2 Diabetes
Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung führen zum relativen Insulinmangel, der sich später durch Gluco- und Lipotoxizität zum absoluten Insulinmangel steigert
3. andere spezifische Diabetesformen
A. genetische Defekte der B-Zellfunktion B. genetische Defekte der Insulinwirkung C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas D. Endokrinopathien E. Medikamenten-induzierter Diabetes F. Infektionen
4. Gestationsdiabetes

Tabelle 1.1.: Einteilung des Diabetes mellitus (nach: Alberti und Zimmet, 1998; Expert Committee, 2003)

Bei der gestörten Insulinsekretion von Typ 2 Diabetikern liegen neben einer Reduktion des Ausmasses der Sekretion oft auch qualitative Veränderungen im Sekretionsverhalten vor. So konnte beobachtet werden, dass die pulsatile Insulinsekretion einiger Patienten, die an einem Typ 2 Diabetes erkrankt waren, durch vermehrtes Auftreten von verlängerten und irregulären Oszillationen gekennzeichnet war. Es wird angenommen, dass der Verlust der pulsatilen Insulinsekretion ein frühzeitiges Symptom des Typ 2 Diabetes ist (Lefebvre et al., 1987; Polonsky et al., 1988; Porksen et al., 2002).

Schädigende Auswirkungen auf den Organismus hat vor allem die dauerhafte pathologische Erhöhung der Blutzuckerkonzentration (Hyperglykämie). Es bilden sich dadurch die gefürchteten diabetischen Spätkomplikationen wie die Mikroangiopathie (Janka et al., 2000) und die Makroangiopathie aus (Panten und Rustenbeck, 2005).

Bei den Mikroangiopathien kommt es durch die Glykosilisierung des Endothels der kleinen Blutkapillaren zu deren Schädigung, mit der Folge der Ausbildung von Retinopathie (Durchblutungsstörungen des Augenhintergrunds mit Netzhautblutungen, Mikroaneurysmen und Lipidablagerungen), von Nephropathie (Glomerulosklerose mit Schädigung der glomerulären Kapillaren der Niere) und von Neuropathie (Degeneration peripherer Nerven mit der Folge von Sensibilitätsstörungen). Die Retinopathie führt nicht selten zu Erblindung, die Nephropathie häufig zum Nierenversagen mit Dialysepflichtigkeit und die Neuropathie zu Sensibilitätsstörungen im sensiblen und vegetativen Nervensystem. Im schlimmsten Fall kommt zur Entwicklung eines diabetischen Fusses (Boulton, 2000; Heller et al., 2004).

Bei den Makroangiopathien sind die grossen Arterien von der Glykosilierung betroffen mit der Folge der Ausbildung atherosklerotischer Veränderungen. Das Risiko, einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall zu erleiden, ist stark erhöht (Janka et al., 2000).

Die möglichen Spätfolgen eines Diabetes mellitus senken die Lebensqualität und Lebenserwartung der Patienten drastisch und zwingen zur Entwicklung möglichst sinnvoller Therapiemöglichkeiten.

1.2 Die Regulation der Insulinsekretion aus den B-Zellen in Langerhans'schen Inseln des Pankreas

Die Langerhans'schen Inseln liegen verstreut im Pankreas und machen ca. 2 - 5 % des gesamten Organs aus. Das menschliche Pankreas enthält etwa eine Million Langerhans'sche Inseln mit jeweils 1000 - 5000 Zellen (Porksen et al., 2002). Die Pankreasinseln sind kleine rundliche, selten längliche endokrine Epithelkomplexe, die im HE-gefärbten mikroskopischen Präparat als helle Bezirke zu erkennen sind. Ihr Durchmesser schwankt zwischen 200 µm und 500 µm. In diesen Pankreasinseln kommen vier verschiedene Zelltypen in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vor. Die B-Zellen, die die wichtigste und am genauesten untersuchte Zellgruppe darstellt, machen ca. 70 - 90 % der Zellen in einer Pankreasinsel aus und befinden sich vor allem in der Mitte der Langerhans'schen Insel. Sie produzieren das blutzuckersenkend wirkende Hormon Insulin. Die Glucagon-sezernierenden A - Zellen, die ca. 10 - 20 % des Zellanteils in einer Pankreasinsel ausmachen, sind eher in der Peripherie der Langerhans'schen Insel anzutreffen. Daneben kommen noch Somatostatin-sezernierende D-Zellen mit einem Zellanteil von ca. 10 % und PP-Zellen (Zellanteil ca. 1 %) vor .

Die Freisetzung des blutzuckersenkend wirkenden Hormons Insulin aus den B-Zellen der Pankreasinseln wird durch Nährstoffe ausgelöst. *In vitro* werden neben Glucose auch Substanzen wie α -Ketoisocaproinsäure (das Desaminierungsprodukt der Aminosäure Leucin,

Einleitung

abgekürzt KIC), α -Ketocaprionsäure (das Isomer von KIC, abgekürzt KC), L-Glutamin und β -Phenylpyruvat (die Ketosäure von L-Phenylalanin) zur Stimulation der Insulinsekretion eingesetzt (Lenzen und Panten, 1981). KIC stimuliert eine schnelle, langanhaltene und starke Insulinsekretion (Panten, 1975), ist aber kein Substrat für die mitochondriale ATP-Produktion (Lembert und Idahl, 1998). KIC muss zuvor durch Glutamat zu 2-Ketoglutarat und Leucin transaminiert werden. Das Transaminierungsprodukt 2-Ketoglutarat stimuliert den Citratzyklus und aus der intramitochondrialen Verstoffwechselung entstehen unter anderem Reduktionsäquivalente (NAD(P)H, FADH₂). Die starke Produktion reduzierender Äquivalente führt zur Aktivierung der Atmungskette und damit wird die Umwandlung von ADP zu ATP begünstigt.

Physiologisch relevant sind die Nährstoffe Glucose und die Aminosäure L-Leucin in Verbindung mit Glutamin (Panten und Rustenbeck, 2005). Durch Verstoffwechselung dieser Nährstoffe kommt es zur Aktivierung des Energiestoffwechsels und damit zur Auslösung der Stimulus-Sekretions-Kopplung. Daneben können auch freie Fettsäuren die Insulinfreisetzung fördern, dieser Effekt wird aber über einen direkten rezeptorvermittelten Prozess verursacht (Fujiwara et al., 2005). Des weiteren kann die Insulinsekretion *in vivo* natürlich auch über hormonale Regulationsmechanismen beeinflusst werden. Einige gastrointestinale Hormone wie GIP (glucose-dependent insulin-releasing peptide) und GLP-1 (glucagon like peptide) üben modulierende Effekte auf die Insulinsekretion aus (Creutzfeldt, 2001). Und auch das vegetative Nervensystem hat Anteil an der Regulation der Insulinsekretion (Ashcroft und Rorsman, 1989). Die Aktivierung von m-Cholinorezeptoren steigert die Sekretion (Samols und Weir, 1979), wohingegen eine Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren die Insulinsekretion hemmt (Robertson und Porte, 1973; Samols und Weir, 1979).

Unter physiologischen Bedingungen stellt die Erhöhung der Blutglucosekonzentration den wichtigsten Reiz zur Auslösung der Insulinsekretion dar. Die biphasische Freisetzung der Insulinsekretion aus der B-Zelle wird in der Regel durch einen stimulatorischen Glucose-Plasmaspiegel (> 7 mM) initiiert (Dean und Matthews, 1968). Mittels des niedrigaffinen GLUT-2-Transporters (K_M -Wert: 20 mM), der in hoher Dichte in der Zellmembran der B-Zellen des Pankreas vorkommt (Schuit et al., 2001), wird Glucose in die B-Zelle aufgenommen (Thorens et al., 1988). Dann kommt es durch die Verstoffwechselung der Glucose zur Aktivierung des Energiestoffwechsels der B-Zelle (Malaisse, 1996; Matschinsky, 1996), was die eigentliche Voraussetzung für die Glucose-induzierte Steigerung der Insulinsekretion ist (Coore und Randle, 1964; Ashcroft und Randle, 1968). Der erste Schritt der Glucoseverstoffwechselung in der Glykolyse wird durch das Enzym Glukokinase

Einleitung

katalysiert (Lenzen und Panten, 1988; German, 1993), ein Enzym, das aufgrund eines hohen K_M -Wertes im millimolaren Bereich (10 mM) seine Aktivität gerade im Bereich der (patho)physiologischen Blutglucosekonzentrationen variiert (Meglasson und Matschinsky, 1986). Folge ist eine genaue Korrelation der Geschwindigkeit des Glucosemetabolismus an das momentane Glucoseangebot (Matschinsky, 1996). Von besondere Bedeutung ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Phosphofruktokinase, dass die Phosphorylierung von Glucose-6-phosphat katalysiert. Es wird davon ausgegangen, dass dieses Enzym an der Entstehung von Oszillationen in der B-Zelle beteiligt ist (Kennedy et al., 2002; Porksen et al., 2002). Die vermehrte Bildung von Glykolyseprodukte bewirkt in den Mitochondrien dann die gesteigerte Bildung von ATP aus ADP (Ashcroft et al., 1973) und dieser veränderte ATP/ADP-Quotient führt dann zu der Auslösung der K_{ATP} -Kanal-abhängigen Freisetzung von Insulin aus der B-Zelle. Eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Blut führt somit zu einer Erhöhung der Insulinsekretion. Die Beziehung zwischen Glucoseerhöhung und Insulinsekretion verläuft sigmoidal (Turner et al., 1979) mit der grössten Steigung zwischen 6 und 12 mmol/l bei Menschen (Byrne et al., 1996) und zwischen 8 und 17 mmol/l bei Albinomäusen (Lenzen, 1979).

Wenn der ATP/ADP-Quotient sich zugunsten von ATP verschiebt, kommt es - nach Erreichen eines Schwellenwertes - zum Schliessen des ATP-abhängigen Kaliumkanals in der Plasmamembran der B-Zelle (Ashcroft et al., 1984; Cook und Hales, 1984; Ashcroft und Rorsman, 1989). Der K_{ATP} -Kanal setzt sich zusammen aus jeweils 4 Sulfonylharnstoff-rezeptoren vom Typ 1 (SUR1) und 4 porenbildenden Untereinheiten (Kir6.2). ATP bindet an eine intrazellulär gelegene Struktur des K_{ATP} -Kanals am SUR1 (Clement et al., 1997; Aguilar-Bryan et al., 1995). Es kommt dann zu einer Verminderung des K^+ -Ausstroms (Nichols und Lopatin, 1997) mit der Folge der Depolarisation der Plasmamembran (Ashcroft und Rorsman, 1989; Dunne et al., 1994; Atwater et al., 1996), d.h. einem Anstieg des Membranpotentials von ca. - 65 mV (Best, 1997) auf ca. - 40 mV (Satin und Cook, 1985).

Die durch Glucose ausgelöste Depolarisation der B-Zellen zeigt oszillierendes Verhalten (Henquin und Meissner, 1984). Dabei wird die Phase der Auslösung des Aktionspotentials als „burst“ bezeichnet, die sich anschliessende Phase der Repolarisation „silent intervall“. Der Wechsel dieser beiden Phasen charakterisiert dann das oszillierende Verhalten des Membranpotentials und ist auch bekannt unter der Bezeichnung „slow waves“ (Dunne et al., 1994). Diesen Aktionspotentialen wird die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ zugeschrieben (Rorsman et al., 1988; Dunne et al., 1994) und es wird dabei davon

Einleitung

ausgegangen, dass die Induktion synchroner cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen Folge der „slow waves“ ist (Meissner, 1976; Bergsten et al., 1994; Gilon et al., 2002). Ob diese Oszillationen ihren Ursprung im Energiestoffwechsel haben oder über andere Mechanismen moduliert werden, ist noch nicht geklärt (Kjems et al., 2002; Kennedy et al., 2002; Ainscow und Rutter, 2002; Porksen et al., 2002). Es konnte aber bereits belegt werden, dass sich sowohl die Oszillationen des Membranpotentials als auch die cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen bei Erhöhung der Glucosekonzentration selten in einzelnen B-Zellen (Atwater et al., 1996; Porksen et al., 2002; Gilon et al., 2002), aber häufiger in B-Zellen innerhalb eines Zellverbandes einer Pankreasinsel beobachten lassen (Atwater et al., 1996; Speier et al., 2005; Porksen et al., 2002; Gilon et al., 2002). Für die Entwicklung solcher Oszillationen wurden Zell-Zell-Interaktionen, z.B. die Kopplung über gap junctions, verantwortlich gemacht (Mears et al., 1995; Atwater et al., 1996; Andreu et al., 1997; Jonkers et al., 1999).

Die durch die Depolarisation der Plasmamembran ausgelöste Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ (VDCC; Henquin und Meissner, 1984; Matthews, 1985; Rorsman et al., 1988) führt schliesslich zum Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration in der Nähe der Cytoplasmamembran (Ämmälä et al., 1993). Dieser Ca^{2+} -Einstrom triggert dann auch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Speicherkompartimenten (sog. Ca^{2+} -induzierte- Ca^{2+} -Freisetzung; Miura et al., 1997). Von Bedeutung ist, dass neben spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen vom L-Typ in der Plasmamembran der B-Zelle auch solche vom R-Typ existieren ($\text{Ca}_v2.3$; Mears, 2004), deren Öffnung ebenfalls zum Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beitragen (Yang und Berggren, 2005).

Schliesslich stellt der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der B-Zelle das Triggersignal für die Exozytose der insulinhaltigen Sekretgranula dar (Matthews, 1970), woraus dann die Freisetzung des Insulins aus den B-Zellen resultiert (Panten, 1987). Dabei ist die Sekretion normalerweise pulsatil, was eine Folge des oszillatorischen Verhaltens im Ca^{2+} -Anstieg in Langerhans'schen Inseln ist (Ainscow und Rutter, 2002; Kjems et al., 2002; Porksen et al., 2002).

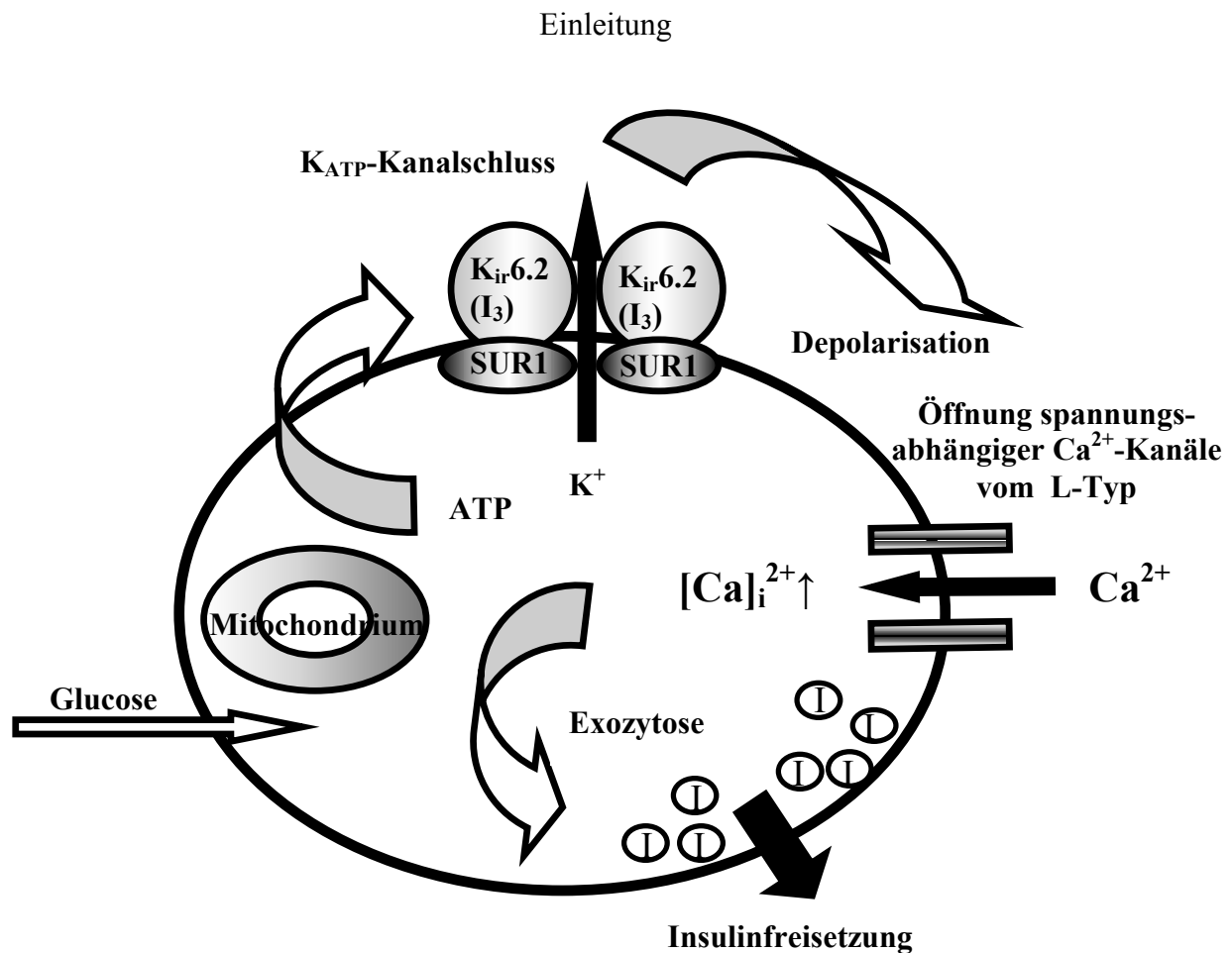


Abb. 1.1.: Die Stimulation der Insulinsekretion in einer pankreatischen B-Zelle. Durch die Verstoffwechselung von Glucose kommt es zum Anstieg des ATP/ADP-Konzentrationsverhältnisses im Cytosol der B-Zelle. Dies führt zur Blockade des K_{ATP} -Kanals. Die Folge ist die Depolarisation der Plasmamembran und die Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ. Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt durch den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen an, was die Auslösung der Exozytose der Insulingranula zur Folge hat und damit die Freisetzung des Insulins aus der B-Zelle.

Dieser K_{ATP} -Kanal-abhängige Effekt - oder auch „triggering pathway“ - wurde Mitte der 80er Jahre als hinreichend empfunden und auch als Konsensushypothese bezeichnet. Der „triggering pathway“ bezeichnet den K_{ATP} -Kanal als das Bindeglied zwischen dem Energiestoffwechsel und den Änderungen des Ionentransports in der B-Zellmembran (Trube et al., 1986; Dunne und Petersen, 1991). Daraus lässt sich die Bedeutung dieses Mechanismus als ein die Insulinsekretion auslösenden Effekt ableiten.

Zusätzlich gibt es aber auch K_{ATP} -Kanal-unabhängige Signale, die ebenfalls vom Energiestoffwechsel ausgehen. Nährstoffe wie Glucose, D-Glyceraldehyd und α -Ketoisocapronsäure erzeugen weitere Signale, die eine Verstärkung der Insulinsekretion bewirken (Panten et al., 1988; Gembal et al., 1992; Straup und Sharp, 2002). Es konnte von der Arbeitsgruppe um Panten zum ersten Mal 1988 belegt werden, dass die Insulinsekretion bei Erhöhung der Glucosekonzentration über die allein durch Sulfonylharnstoffe ausgelöste Sekretionsrate

Einleitung

hinaus gesteigert werden konnte, wenn der K_{ATP} -Kanal durch maximal wirksame Sulfonylharnstoffkonzentrationen komplett blockiert war (Panten et al., 1988). Die Gruppe um Henquin beobachtete dann später, dass ein Glucose-induzierter Anstieg der Insulinsekretion trotz vollständiger Öffnung des K_{ATP} -Kanals durch Diazoxid - bei gleichzeitiger durch hohe extrazelluläre K^+ -Konzentrationen induzierter Depolarisation der Plasmamembran - bewirkt werden konnte (Gembal et al., 1992; Sato et al., 1992). Diese K^+ -induzierte Insulinsekretion in Gegenwart von Diazoxid war deutlich abhängig von der Glucosekonzentration: Bereits Glucosekonzentrationen im Bereich von 2 - 5 mM Glucose wirkten verstärkend (Gembal et al., 1992; Sato und Henquin, 1998).

Damit konnte belegt werden, dass sowohl die Verstoffwechselung der Glucose als auch ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration Voraussetzungen für den Glucose-induzierten K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effekt (sog. „*amplifying pathway*“) auf die Insulinsekretion sind. Konkret bedeutet diese Abhängigkeit des verstärkenden Effektes vom $[Ca^{2+}]_i$ -Signal, dass die über den „*amplifying pathway*“ vermittelten Effekte nicht induziert werden können, solange $[Ca^{2+}]_i$ nicht erhöht ist (Gembal et al., 1993). Der K_{ATP} -Kanal-abhängige Effekt („*triggering pathway*“) ist demnach der auslösende Effekt, wohingegen der K_{ATP} -Kanal-unabhängige Effekt („*amplifying pathway*“) dessen Wirkung verstärkt und optimiert (Gembal et al., 1992 und 1993; Henquin, 2000), worin auch seine physiologische Bedeutung liegt (Taguchi et al., 1995; Seghers et al., 2000).

Der Verlauf des „*amplifying pathways*“ ist aber noch nicht vollständig geklärt. Da der „*amplifying pathway*“ eine Veränderung des energetischen Zustandes der B-Zelle und damit eine Veränderung des ATP/ADP-Quotienten erfordert (Gembal et al., 1993; Rustenbeck et al., 1997a; Rustenbeck, 1999a), wird vermutet, dass ATP und/oder auch andere Nukleotide und Intermediate, die eine Intensivierung des Energiestoffwechsels in den Mitochondrien induzieren können (Komatsu et al., 1997; Maechler und Wollheim, 1999), am ehesten als Vermittler des K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effekts in Frage kommen (Gembal et al., 1993; Detimary et al., 1994; Sato und Henquin, 1998). Außer ATP wurde dem L-Glutamat eine Signalfunktion im Glucose-induzierten K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Effekt zugeschrieben, da L-Glutamat - freigesetzt aus dem mitochondrialen α -Ketoglutarat durch die katalytische Wirkung der Glutamat-Dehydrogenase - die Ca^{2+} -induzierte Exozytose der Insulingranula kontrollieren und verstärken sollte (Maechler und Wollheim, 1999). Insbesondere wurde eine Aufnahme von L-Glutamat in insulinhaltige Sekretgranula diskutiert (Rorsman und Renström, 1999). Da aber die Insulinsekretion durch eine Erhöhung der Glutamatkonzentration in B-Zellen nicht stimuliert werden konnte, wird mittlerweile davon

ausgegangen, dass eine Vermittlung des „*amplifying pathways*“ über L-Glutamat nicht sehr wahrscheinlich ist (MacDonald und Fahien, 2000; Yamada et al., 2001).

In Anbetracht der ständigen Suche nach oralen Antidiabetika, die die Insulinfreisetzung einer B-Zelle möglichst nur verstärken sollen, damit lebensbedrohliche Hypoglykämien vermieden werden können, gewinnt demnach insbesondere der K_{ATP} -Kanal-unabhängige Mechanismus oder auch „*amplifying pathway*“ als Angriffsort für selektiv wirkende Substanzen an grosse Bedeutung.

1.3 Etablierte Therapiemöglichkeiten beim Typ 2 Diabetes

Erste therapeutische Maßnahme bei bestehender Hyperglykämie und Hyperinsulinämie infolge Überernährung ist eine Normalisierung des Körpergewichts zur Minimierung der Wahrscheinlichkeit der Manifestation eines Typ 2 Diabetes insbesondere bei Patienten mit familiärer Vorbelastung.

Besteht weiterhin eine Hyperglykämie ($HbA_{1c} > 7\%$ nach 3 Monaten), können orale Antidiabetika eingesetzt werden (Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft, 2002). Übergewichtige Patienten werden zunächst - gemäss der Praxisleitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (2002) - mit dem Biguanid Metformin behandelt. Metformin entfaltet seinen blutzuckersenkenden Effekt hauptsächlich durch Verstärkung der Insulin-induzierten Hemmung der hepatischen Gluconeogenese (Wollen und Bailey, 1988).

Sulfonylharnstoffe stimulieren die endogene Insulinsekretion durch komplette Blockade der K_{ATP} -Kanäle in der B-Zellmembran (Sturgess et al., 1985, Trube et al., 1986, Panten et al., 1996). Da aber die Sulfonylharnstoffe die Insulinsekretion auch bei niedrigen Plasmagluconespiegeln steigern (Malaisse et al., 1967; Gorus et al., 1988), besteht für die Patienten ein beträchtliches Risiko der Ausbildung von Hypoglykämien (Ferner und Neil, 1988; Groop, 1992; Wolffenbuttel, 1999).

Neben den Sulfonylharnstoffen gibt es noch die Sulfonylharnstoff-Analoga Repaglinid und Nateglinid. Ihr Wirkprinzip entspricht dem der Sulfonylharnstoffe (Fujita et al., 1996, Fuhlendorff et al., 1998), nur ihre Pharmakokinetik weist deutliche Unterschiede auf (Kikuchi, 1996). Da sie schneller anfluten und auch schneller abgebaut werden, ist eine mahlzeitenbezogene Einnahme möglich, so dass vermutlich das Risiko von Hypoglykämien reduziert werden kann (Tronier et al., 1995, Ikenoue et al., 1997).

Weiterhin wird der α -Glukosidasehemmstoff Acarbose verwendet. Nach Applikation kommt es durch kompetitive Hemmung intestinaler α -Glukosidasen zur verlangsamten Spaltung von Oligosacchariden und somit zur Verzögerung der Resorption aus dem Dünndarm

(Fölsch und Lembcke, 1991) und damit insbesondere zur Senkung von postprandialen Hyperglykämien.

Eine weitere wichtige Substanzgruppe, die die Insulinresistenz beeinflussen kann, ist die neuere Arzneistoffgruppe der Thiazolidindione (sog. Insulinsensitizer; Spiegelmann, 1998) mit den Wirkstoffen Rosiglitazon und Pioglitazon. Der Wirkort dieser Substanzen befindet sich in den Fett- und Muskelzellen. Dabei interagieren diese Wirkstoffe mit dem intranukleären Peroxisom Proliferator Activated Receptor γ (Lehmann et al., 1995) und werden deshalb auch als PPAR γ -Agonisten bezeichnet. Die Folge ist eine Änderung der Genexpression für Proteine, die insgesamt eine Reduktion der Insulinresistenz im peripheren Gewebe bewirkt (Mudaliar und Henry, 2001; Stumvoll und Häring, 2002). Nachteil ist, dass diese Therapie häufig zu Gewichtszunahmen führt (Mudaliar und Henry, 2001; Stumvoll und Häring, 2002).

Da alle zur Zeit einsetzbaren orale Antidiabetika im Verlaufe der Behandlung an Wirksamkeit verlieren, vermutlich wegen einer Progredienz der Erkrankung, wird dann häufig die Verabreichung von Insulin notwendig (Karam et al., 1986; Kawaki et al., 1999; Turner et al., 1999).

1.4 Glucose-selektive insulinotrope Pharmaka: GLP-1-Analoga und Imidazoline

Auf der Suche nach Pharmaka, die die Insulinsekretion nur verstärken, d. h. nur dann steigern, wenn die Blutglucosekonzentration erhöht ist und auf diese Weise das Risiko von Hypoglykämien minimieren können, wird derzeit der Substanzgruppe der GLP-Analoga besondere Bedeutung beigemessen. Ein wichtiges GLP-1-Analogon ist die Substanz Exendin-4 (Young et al., 1999; Nielsen et al., 2004), dass aber als Peptid injiziert werden muss und nicht oral verfügbar ist. Die GLP-1-Analoga und auch das GLP-1 selbst wirken Glucose-selektiv, d.h. sie steigern die Insulinsekretion nur bei erhöhter Glucosekonzentration. Man nennt solche Substanzen auch Potentioren der Insulinsekretion. Sie stehen den Substanzen gegenüber, die schon bei basaler Glucosekonzentration die Insulinsekretion steigern (z.B. Sulfonylharnstoffe) und als Initiatoren der Insulinsekretion bezeichnet werden (Ashcroft und Rorsman, 1989).

Untersuchungen ergaben, dass GLP-1 an den B-Zellen des Pankreas eine Steigerung der Insulinsekretion bei gegenüber Basalwerten erhöhten Glucosekonzentrationen bewirkt (Ahren, 1998; MacDonald et al., 2002). Dieser Effekt wird durch Bindung an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor ausgelöst (Ahren, 1998) mit der Folge einer Aktivierung der Adenylatzyclase und einem Anstieg des cAMP-Gehalts. Neuere Untersuchungen ergaben,

Einleitung

dass cAMP nicht nur die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) vermittelt, wodurch eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus internen Ca^{2+} -Speichern über die Öffnung von $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Rezeptoren (Liu et al., 1998; Dyachok und Gylfe, 2004) oder Ryanodinrezeptoren (Holz et al., 1999; Kang und Holz, 2002) erfolgt, sondern auch die Aktivierung des Proteins EPAC (cAMPGEFs = cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors; Holz, 2004). Auch dieses Protein vermittelt eine cAMP-abhängige Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern (Holz, 2004). Durch diese Aktivierungsprozesse kommt es zu einer veränderten Verteilung des intrazellulären Calciums und zu einer gesteigerten Exozytoserate (Holst, 2002; Holz, 2004) und damit zu einer Verstärkung der Insulinsekretion.

Interessanterweise steigern auch einige Imidazoline wie RX871024 (Zaitsev et al., 1996) und Efaroxan (Chan und Morgan, 1990) die Insulinsekretion Glucose-selektiv und wirken damit - ähnlich wie GLP-1 und dessen Analoga - als Potentiatoren der Insulinsekretion.

Die Entwicklung der Imidazoline als Substanzen mit insulinsekretionssteigernder Wirkung hat ihren Ursprung in der Beobachtung, dass das Imidazolin Phentolamin - ein unselektiver Adrenozeptor-Antagonist - die Insulinsekretion steigert, wobei zunächst angenommen wurde, dass dieser Anstieg Folge einer α_2 -Rezeptorblockade ist (Robertson und Porte, 1973; Ahren und Lundquist, 1985; Broadstone et al., 1987). Weitere Untersuchungen führten dann aber zu dem Schluss, dass die Phentolamin-induzierte Insulinsekretionssteigerung nicht durch eine Reduktion des Sympathikotonus verursacht wird (Östenson et al., 1988), sondern ein substanzspezifischer Effekt von Substanzen mit einer Imidazolinstruktur ist (Schulz und Hasselblatt, 1988; Schulz und Hasselblatt, 1989a und b).

Im Anschluss daran begann dann die Suche nach spezifischen Bindungsstellen für Imidazoline. Unabhängig von α_2 -Adrenozeptoren konnten Bindungsstellen für Imidazoline nachgewiesen werden, sog. I_1 -Imidazolinrezeptoren im Hirnstamm, in der Niere und in Thrombozyten verschiedener Spezies und sog. I_2 -Imidazolinrezeptoren in peripheren Geweben und im Hirngewebe von Säugern (Ernsberger et al., 1987; Couprie et al., 1987; Michel und Ernsberger, 1992). Mechanistisch wurde die Wirkung von Phentolamin durch die Beobachtung verständlich, dass durch Phentolamin eine K_{ATP} -Kanalblockade bewirkt werden konnte (Plant und Henquin, 1990; Rustenbeck et al., 1997b). Bindungsstudien zufolge konnte die Bindungsstelle von Phentolamin am K_{ATP} -Kanal nicht identisch sein mit derjenigen von Sulfonylharnstoffen (Hasselblatt et al., 1992). Da die insulinsekretionssteigernden Effekte von Imidazolinen nicht mit ihren Angriffsorten für I_1 - und I_2 -Rezeptoren korrelierten, wurde von der Arbeitsgruppe um Morgan die Existenz eines B-Zell-spezifischen

I₃-Rezeptors postuliert (Chan et al., 1993; Chan et al., 1994). Ob dieser I₃-Rezeptor ein membranständiger Rezeptor ist, über den die Vielzahl von Effekten der Imidazoline in der B-Zelle - insbesondere auch der K_{ATP}-Kanalschluss - vermittelt werden, ist noch nicht geklärt.

Allgemein wird argumentiert, dass für das Vorliegen eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit Signalkaskade drei Kriterien erfüllt sein müssen: 1. Die Stereoisomere eines Bindungsmoleküls an diesem Rezeptor müssen sich in ihrer Wirksamkeit unterscheiden (Kriterium der Stereoselektivität). 2. eine Langzeitexposition mit Agonisten, d.h. mit stimulatorisch wirksamen Substanzen, muss eine Desensibilisierung auslösen. 3. Eine Identifizierung eines Antagonisten für den membranständigen Rezeptor muss möglich sein.

Die Arbeitsgruppe um Morgan und Chan konnten mit einigen Befunden die Vermutung unterstützen, dass diese drei Kriterien für die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline erfüllt sind (Chan et al., 1993). Bezüglich Kriterium 1 konnte sie zeigen, dass die Stereoisomere des insulinsekretionssteigernden Imidazolins Efaroxan unterschiedlich starke Effekte bewirkten: 1. Das (+)-Enantiomer des Efaroxans bewirkte im Vergleich zum (-)-Enantiomer eine stärkere Erhöhung der durch α_2 -Agonisten gehemmten Insulinsekretion. 2. Das (-)-Enantiomer des Efaroxans steigerte die durch Diazoxid gehemmte Insulinsekretion stärker als das (+)-Enantiomer in äquimolaren Konzentrationen, wobei diese Wirkung über Effekte auf K_{ATP}-Kanäle vermittelt wurde. 3. Die eigene insulinsekretionssteigernde Wirkung beider Stereoisomere unterschieden sich deutlich: die steigernde Wirkung des (-)-Enantiomers des Efaroxans war in Gegenwart von 6 mM Glucose fast doppelt so stark ausgeprägt wie diejenige des (+)-Enantiomers. Allerdings stellte die Arbeitsgruppe um Henquin diese Auffassung ein Jahr später in Frage, indem sie zeigten, dass die beschriebene Stereoselektivität nur für die über α_2 -Adrenozeptoren vermittelten Wirkungen gilt, nicht aber für die K_{ATP}-Kanalblockade, die letztlich für die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline verantwortlich gemacht wird (Jonas et al., 1994). Schliesslich stellte die Arbeitsgruppe um F. Ashcroft die These auf, dass Phentolamin durch direkte Blockade der Ionenpore Kir6.2 den K_{ATP}-Kanal schliesst (Proks und Ashcroft, 1997). Dahingehend wurde auch die Hypothese aufgestellt, dass der I₃-Rezeptor möglicherweise auch Teil der kanalporenformenden K_{ATP}-Kanaluntereinheit Kir6.2 sein könnte (Proks und Ashcroft 1997; Monks et al., 1999).

Das zweite Kriterium - die Auslösung einer homologen Desensibilisierung durch Imidazoline - wurde zum ersten Mal auch durch die Arbeitsgruppe um Morgan und Chan bestätigt (Chan et al., 1993). Unter einer homologen Desensibilisierung wird das selektive Ausbleiben einer Reaktion auf Stimuli einer bestimmten Substanzklasse verstanden, während auf Stimuli einer

anderen Substanzklasse eine unveränderte Reaktion erfolgt. Chan et al. (1993) konnte zeigen, dass aktive Imidazoline wie Phentolamin und Efaroxan im Gegensatz zu inaktiven Imidazolinen wie Idazoxan eine homologe Desensibilisierung bewirken. Aber auch in diesem Fall gehen die Auffassungen auseinander. Die Arbeitsgruppe um Rustenbeck (Rustenbeck et al., 2001 a und b) konnte zeigen, dass durch bestimmte Stimuli, die eine langanhaltende Depolarisation bewirken, eine Desensibilisierung gegenüber der durch Imidazoline induzierten Steigerung der Insulinsekretion ausgelöst werden kann. Des weiteren konnten sie belegen, dass die mit Imidazolinen vorinkubierten Pankreasinseln auch gegenüber anderen durch Depolarisation insulinsekretionssteigernd wirkenden Stimuli wie Tolbutamid oder hohes extrazelluläres Kalium desensibilisierten, was bedeutet, dass diese Stimuli in solchen Inseln eine verminderte Steigerung der Insulinsekretion im Vergleich zur Kontrolle induzieren. Damit ist auch umstritten, ob das oben erwähnte zweite Kriterium für stimulatorisch wirkende Imidazoline erfüllt ist.

Auch die dritte Voraussetzung, d.h. die Identifizierung eines Antagonisten, erfolgte durch die Gruppe Morgan und Chan mit den Substanzen KU14R (Morgan et al., 1996) und RX801080 (Chan et al., 1997). Die Substanz KU14R konnte als Antagonist der Efaroxan-induzierten insulinsekretionssteigernden Wirkung identifiziert werden (Morgan et al., 1996). Die antagonistische Wirkung dieses Imidazols ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass KU14R K_{ATP} -Kanäle, die durch Efaroxan geschlossen sind, wieder öffnen kann (Chan et al., 1998). Aber auch hier sind die Auffassungen unterschiedlich. Die Arbeitsgruppen um Flatt und um Taberner zeigten, dass KU14R nicht antagonistisch, sondern additiv wirken kann (Ball et al., 2000; Mayer und Taberner, 2002). Somit wird deutlich, dass das Vorliegen der 3 Kriterien für eine rezeptorvermittelte Wirkung der Insulinsekretionssteigerung durch Imidazoline umstritten ist.

Es wird mittlerweile davon ausgegangen, dass mehrere voneinander unabhängige Effekte die insulinsekretionssteigernde Wirkung der Imidazoline induzieren. Zum Beispiel haben Untersuchungen ergeben, dass das Imidazolin RX871024 exozytotische Prozesse verstärken kann (Zaitsev et al., 1996), vermutlich vermittelt über einen Anstieg von Diacylglycerol (DAG), einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und der darauffolgenden Stimulierung der Proteinphosphorylierung (Zaitsev et al., 1999; Efendic et al., 2002). Des weiteren konnten Imidazoline wie BL11282 synthetisiert werden, die keinen K_{ATP} -Kanalblockierenden Effekt ausüben (Efanov et al., 2001), aber ähnlich wie RX871024 und Efaroxan zu einer Glucose-selektiven Stimulation der Insulinsekretion führen. Solche Imidazoline werden als Imidazoline der zweiten Generation bezeichnet (Efendic et al., 2002).

Einleitung

Ein Problem bei dieser Datenlage ist, dass Imidazoline den K_{ATP} -Kanal blockieren und gleichzeitig die Insulinsekretion Glucose-selektiv steigern können. Somit stellt sich die Frage, ob eine Blockade von K_{ATP} -Kanälen auch bei basaler oder abwesender Glucosekonzentration grundsätzlich zu einer Stimulation der Insulinsekretion führen kann, wie allgemein angenommen wird. Von besonderem Interesse ist unter diesem Aspekt der Befund, dass die insulinsekretionssteigernde Wirkung einiger Imidazoline der ersten Generation unterschiedlich ist. Bekannt ist, dass die vier in dieser Arbeit untersuchten Imidazoline Efaroxan, Phentolamin, Alindin und RX871024 den K_{ATP} -Kanal nahezu vollständig schliessen (Plant und Henquin, 1990; Chan et al., 1991; Jonas et al., 1992; Rustenbeck et al., 1997b). Der insulinotrope Effekt dieser vier Imidazoline weist aber ausgeprägte Unterschiede vor allem in Bezug auf ihre Glucoseselektivität auf. So steigert Alinidin die Insulinsekretion nur in Anwesenheit einer Glucosekonzentration, die bereits für sich stimulierend auf die Insulinsekretion wirkt (Rustenbeck et al., 1999b). Und auch der direkte Vergleich von Phentolamin und Efaroxan zeigte, dass die Insulinsekretion durch Phentolamin bereits in Gegenwart basaler Glucosekonzentration (5 mM) stimuliert werden konnte, nicht aber durch Efaroxan (Bleck et al., 2004). Diese unterschiedliche Glucoseselektivität war nicht durch eine unterschiedliche Hemmung der Kanalaktivität und einer unterschiedlich starken Depolarisation zu begründen (Bleck et al., 2004). Es wird deshalb auch bei diesen Substanzen ein heterogenes Spektrum an Wirkungen vermutet, welches es zu klären gilt (Rustenbeck et al., 1998 und 1999b). Insbesondere Efaroxan ist von Interesse, da postuliert wird, dass der Effekt des Efaroxans auf den K_{ATP} -Kanal eine weit geringere Bedeutung für die Wirkung auf die Insulinsekretion hat als die Effekte desselben Imidazolins distal der Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Chan et al., 2001a).

2 Ziele der Arbeit

Eine grosse Anzahl an C₂-substituierten Imidazolinen stimuliert die Insulinsekretion, einige davon zeigen diese Eigenschaft aber nur, wenn die Glucosekonzentration für sich bereits stimulatorisch ist. Diese Eigenschaft kann als Glucoseselektivität bezeichnet werden, um sie von der gewöhnlichen Glucoseabhängigkeit der insulinotropen Wirkung abzugrenzen, die auch den Sulfonylharnstoffen zu eigen ist. Es ist jedoch nicht klar, durch welche Wirkung oder Kombination von Wirkungen diese therapeutisch interessante Charakteristik zustande kommt. Der von den Imidazolinen bewirkte Schluss des K_{ATP}-Kanals erklärt die insulinsekretorische Wirkung, nicht jedoch die Glucoseselektivität. Der Nachweis zusätzlicher Wirkungen mit dem Imidazolin RX871024 und die Glucose-selektive Insulinsekretionssteigerung durch neu synthetisierte Imidazoline, die den K_{ATP}-Kanal nicht hemmen, haben zu der Auffassung geführt, dass die Glucoseselektivität durch K_{ATP}-Kanal-unabhängige Effekte bedingt sei. Die Beobachtung, dass ein K_{ATP}-Kanal-blockierendes Imidazolin wie Efaroxan die Insulinsekretion auch dann Glucose-selektiv steigert, wenn es gleichzeitig die K_{ATP}-Kanalaktivität stark hemmt, widerspricht jedoch dieser Interpretation.

In dieser Arbeit sollte die Beeinflussung der Stimulus-Sekretions-Kopplung durch Imidazoline in B-Zellen des Pankreas und ganzen Pankreasinseln der Maus weiter charakterisiert werden, um letztlich den Mechanismus der Glucoseselektivität zu identifizieren.

Die Untersuchungen sollten insbesondere Auskunft geben, wieweit die cytosolische Ca²⁺-Konzentration durch Imidazoline gesteigert wird und ob sich dadurch die insulinotropen Effekte befriedigend erklären lassen. Dazu sollten die Messungen unter Bedingungen stattfinden, die denen der Insulinsekretionsmessungen möglichst nahekommen. Die von den Imidazolin Efaroxan, Phentolamin und RX871024 verursachten Effekte sollten verglichen werden mit den Effekten von Tolbutamid und von K⁺-Depolarisationen, da letztere Stimuli keine Glucoseselektivität besitzen.

Durch Austausch von Glucose gegen α -Ketoisocaprinsäure und Glutamin, die ähnlich wie Glucose als „fuel secretagogues“ wirken, sollte geprüft werden, ob die Glucose-selektivität Teil einer grundsätzlichen Selektivität für effektive Konzentrationen von „fuel secretagogues“ ist.

Ziele der Arbeit

Des weiteren sollten die Messungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration klären, warum das Imidazolinanalogon von Efaroxan, die Substanz KU14R, nicht insulinotrop wirksam ist, obwohl es K_{ATP} -Kanäle blockiert und die B-Zellmembran depolarisiert.

Die Fähigkeit von Diazoxid, die Imidazolin-induzierte Steigerung der Insulinsekretion zu hemmen, sollte charakterisiert werden.

Die Fähigkeit von Fettsäuren, an Stelle von Glucose die Imidazolin-induzierte Insulinsekretion zu ermöglichen, sollte geprüft werden. Dazu sollten auch der Einfluss von Fettsäuren auf die Energetik von B-Zellen und Pankreasinseln mittels der NAD(P)H-Fluoreszenz erfasst werden.

3 Material und Methoden

3.1 Isolierung von Langerhans'schen Inseln aus dem Pankreas von NMRI-Mäusen und deren Kultivierung

3.1.1 Basismedium für die Isolierung von Pankreasinseln und die Perifusion

Das Basismedium der Perifusion stellte einen modifizierten Krebs-Ringer-Bicarbonat-Puffer (Panten et al., 1977) dar. Da der Puffer durch Entwicklung und Entweichen von Kohlenstoffdioxid innerhalb kürzester Zeit alkalisch werden konnte, musste das Basismedium auf einen pH-Wert von 7,4 äquilibriert werden. Sowohl die Zufuhr eines nicht flüchtigen organischen Hepes-Puffers (Lernmark, 1974), der einen Teil des Bicarbonats ersetzte, als auch eine 30minütige Begasung mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlenstoffdioxid) im Anschluss an die Basismedien-Herstellung sollte dies gewährleisten. Die folgenden Stammlösungen des Basismediums wurden, eine konstante Lagerung bei einer Temperatur von 4°C vorausgesetzt, ca. zwei Wochen lang zur täglichen Herstellung des Basismediums verwendet:

- A) Stammlösung 1 (0,9 % NaCl): 18,0 g Natriumchlorid (Fa. Merck, 6404) wurden in 2 l bidest. Wasser gelöst.
- B) Stammlösung 2 (1,15 % KCl): 5,75 g Kaliumchlorid (Fa. Merck, 4936) wurden in 0,5 l bidest. Wasser gelöst.
- C) Stammlösung 3 (1,62 % $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$): 8,1 g Calciumchlorid-Dihydrat (Fa. Merck, 2382), gelöst in 500 ml bidest. Wasser
- D) Stammlösung 4 (2,11 % KH_2PO_4): 5,275 g Kaliumdihydrogenphosphat (Fa. Merck, 4873), gelöst in 250 ml bidest. Wasser
- E) Stammlösung 5 (3,82 % $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$): 9,55 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Fa. Merck, 5886) wurden in 250 ml bidest Wasser gelöst.

Material und Methoden

- F) Stammlösung 6 (1,3 % NaHCO_3): 13,0 g Natriumhydrogencarbonat (Fa. Merck, 6329) wurden in 1 l bidest. Wasser gelöst. Anschliessend erfolgte eine 30minütige Begasung mit Kohlenstoffdioxid.
- G) Stammlösung 7 (6,5 % Fettsäure-freies Albumin, 7,74 % Hepes, 154 mM NaOH): 32,5 g Fettsäure-freies Rinderserumalbumin (Fa. Serva, 11930) wurden in 200 ml bidest. Wasser gelöst. Anschliessend wurden 38,7 mg Hepes (Fa. Sigma, H 3374) in 125 ml bidest. Wasser gelöst. Zu dieser Lösung wurden 77,0 ml 1 N NaOH (Fa. Merck, 9137) zupipetiert. Nun wurden diese beiden Lösungen in einen 500 ml Messkolben überführt und es wurde mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde in 10 ml-Portionen in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

Es entstanden demnach folgende Endkonzentrationen in dem Krebs-Ringer-Hepes-Puffer:

- 200,0 ml Stammlösung 1, die Endkonzentration betrug 118 mM NaCl
- 8,0 ml Stammlösung 2, die Endkonzentration betrug 4,7 mM KCl
- 6,0 ml Stammlösung 3, die Endkonzentration entsprach 2,5 mM CaCl_2
- 2,0 ml Stammlösung 4, die Endkonzentration entsprach 1,2 mM KH_2PO_4
- 2,0 ml Stammlösung 5, die Endkonzentration betrug 1,2 mM MgSO_4
- 34,0 ml Stammlösung 6, die Endkonzentration betrug 20,2 mM NaHCO_3
- 8,0 ml Stammlösung 7, die Endkonzentrationen entsprachen 4,7 mM NaOH, 10 mM Hepes und 0,2 % Albumin

Bei der Durchführung der Perfusionen zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate erfolgte zur Vermeidung von Schaumbildung in den Perfusionsschläuchen die Begasung mit Carbogen zur Stabilisierung des pH-Wertes vor Zugabe der Stammlösung 7.

Zur Herstellung des Basismediums, das bei der Durchführung der Perfusionen zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität verwendet wurde, konnte die Stammlösung 7 als reine Hepeslösung ohne Albumin eingesetzt werden, um mögliche Schaumbildung in den Schlauchsystemen und in den Umströmungskammern während der Perfusionen zu vermeiden. Zur Äquilibration des Perfusionmediums wurde eine 30minütige Begasung mit Carbogen direkt vor und während der Experimente durchgeführt.

Eine Besonderheit war bei den Experimenten mit den Salzen der Palmitinsäure bzw. der 2-Bromopalmitinsäure zu beachten. Um die Bildung eines Chelatkomplexes von Ca^{2+} -Ionen mit diesen Salzen zu vermeiden, wurde die Herstellung des Perifusionsmediums wie folgt etwas modifiziert.

Zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate in Gegenwart dieser langkettigen Fettsäuren wurde das dazu erforderliche Basismedium zunächst nur aus den unter 3.1.1 aufgeführten Stammlösungen ohne Stammlösung 3 und Stammlösung 7 hergestellt (Warnotte et al., 1994). Nach Äquilibrierung des Basismediums auf einen pH-Wert von 7,4 mittels Begasung mit Carbogen konnte die Stammlösung 7 (mit Fettsäure-freiem Albumin) zugefügt werden. Anschliessend wurde das erforderliche Volumen der Stammlösung der Testsubstanz zupipettiert. Dieses so hergestellte Testmedium wurde aufgrund der noch vorhandenen leichten Opaleszenz einer fünfminütigen Behandlung im Ultraschallbad unterzogen. Anschliessend wurde die Stammlösung 3 zugesetzt. Zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Gegenwart der langkettigen Fettsäuren wurde das Basismedium wie unter 3.1.1 beschrieben hergestellt, zunächst jedoch unter Ausschluss der Stammlösung 3. Erst nach Ergänzung des erforderlichen Volumens der Stammlösung der Testsubstanz konnte die Stammlösung 3 zugesetzt werden.

3.1.2 Stammmedien und Testmedien

Die jeweiligen Testmedien wurden täglich frisch hergestellt. Für den Fall, dass die Stammmedien DMSO enthielten, sollte die Endkonzentration von DMSO in den Testmedien $\leq 0,1\%$ ergeben, da dann Eigeneffekte des DMSO nahezu ausgeschlossen werden konnten.

1) Diazoxid (Fa. Sigma, Deutschland), $\text{Mr} = 230,70 \text{ g/mol}$:

Diazoxid-Stammlösung (300 mM): 69,210 mg Diazoxid wurden in 1 ml DMSO gelöst.

Diazoxid-Testmedium (300 μM): 100,0 μl Diazoxid-Stammlösung wurden zu 100 ml Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

2) Alinidin (Fa. Boehringer Ingelheim, Deutschland), $\text{Mr} = 351,0 \text{ g/mol}$:

Alinidin-Stammlösung (100 mM): 35,100 mg Alinidin wurden in 1 ml DMSO gelöst.

Alinidin-Testmedium (100 μM): 100,0 μl Alinidin-Stammlösung wurden 100 ml Glucose-haltigem KR-Puffer zugefügt.

3) **Phentolamin (Fa. Ciba-Geigy, Lörrach, Deutschland), Mr = 377,0 g/mol:**

Phentolamin-Testmedium (100 μ M): 1,885 mg Phentolamin wurden in 50 ml Glucose-haltigem KR-Puffer gelöst.

4) **Efaroxan (Fa. RBI, Natick, MA, USA), Mr = 252,74 g/mol:**

Efaroxan-Stammlösung (10 mM): 2,527 mg Efaroxan wurden in 1 ml bidest. Wasser gelöst.

Efaroxan-Testmedium (100 μ M): 200 μ l Efaroxan wurden zu 20 ml Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

Efaroxan-Testmedium (10 μ M): 20 μ l Efaroxan wurden 20 ml Glucose-haltigem KR-Puffer zugefügt.

Efaroxan-Testmedium (500 μ M): 1 ml Efaroxan wurden zu 20 ml Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

5) **Idazoxan (Fa. Sigma, Deutschland), Mr = 240,70 g/mol:**

Idazoxan-Testmedium (100 μ M): 1,204 mg Idazoxan wurden in 50 ml Glucose-haltigem KR-Puffer gelöst.

6) **RX871024 (Fa. Lilly, Deutschland), Mr = 297,80 g/mol:**

RX871024-Stammlösung (100 mM): 2,234 mg RX871024 wurden in 75 μ l DMSO gelöst.

RX871024-Testmedium (100 μ M): 100,0 μ l RX871024-Stammlösung wurden zu 100 ml Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

RX871024-Testmedium (10 μ M): 10,0 μ l RX871024-Stammlösung wurden 100 ml Glucose-haltigem KR-Puffer zugefügt.

7) **KU14R (Fa. Tocris, Bristol), Mr = 214,27 g/mol:**

a.) KU14R-Stammlösung (100 mM): 5,357 mg KU14R wurden in 250 μ l DMSO gelöst.

KU14R-Testmedium (100 μ M): 10,0 μ l KU14R-Stammlösung wurden 10 ml Glucose-haltigem KR-Puffer zugefügt.

b.) KU14R-Stammlösung (300 mM): 4,995 mg KU14R wurden in 77,7 μ l DMSO gelöst.

KU14R-Testmedium (300 μ M): 10,0 μ l KU14R-Stammlösung wurden in 10 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers pipettiert.

8) Thapsigargin (Fa. Hatzvim, Israel), Mr = 650,76 g/mol:

Thapsigargin-Stammlösung (1 mM): 1,000 mg Thapsigargin wurden in 1,54 ml DMSO gelöst.

Thapsigargin-Testmedium (1 μ M): 10,0 μ l Thapsigargin-Stammlösung wurden 10 ml Glucose-haltigem KR-Puffer zugefügt.

9) Chininhydrochlorid (Fa. Sigma, Deutschland), Mr = 361,0 g/mol:

Chininhydrochlorid-Stammlösung (100 mM): 36,100 mg Chinin-HCl wurden in 1 ml bidest. Wasser gelöst.

Chininhydrochlorid-Testmedium (100 μ M): 10 μ l Chinin-HCl-Stammlösung wurden 10 ml Glucose-haltigem KR-Puffer zugefügt.

10) Tolbutamid (Fa. Serva, Heidelberg), Mr = 270,30 g/mol:

Tolbutamid-Stammlösung (50 mM): 13,515 mg Tolbutamid wurden in 1 ml 0,1 M NaOH gelöst.

Tolbutamid-Testmedium (500 μ M): 100 μ l Tolbutamid-Stammlösung wurden zu 10 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers pipettiert.

Tolbutamid-Testmedium (50 μ M): 10 μ l Tolbutamid-Stammlösung wurden 10 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers zugefügt.

Tolbutamid-Testmedium (10 μ M): 20 μ l Tolbutamid-Stammlösung wurden zu 100 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers pipettiert.

11) Glutamin (Fa. Sigma, Deutschland), Mr = 146,10 g/mol:

Glutamin-Testmedium (1 mM): 14,610 mg Glutamin wurden in 100,0 ml KR-Puffer gelöst.

12) KIC = α -Ketoisocaproensäure (Fa. Sigma, Deutschland), Mr = 152,10 g/mol:

KIC-Testmedium (1 mM): 15,210 mg KIC wurden in 100,0 ml KR-Puffer gelöst.

KIC-Testmedium (3 mM): 45,630 mg KIC wurden in 100,0 ml Glutamin-haltigem KR-Puffer gelöst.

13) Palmitinsäure (Fa. Sigma, Deutschland), Mr = 256,40 g/mol:

Palmitinsäure-Stammlösung (100 mM): 25,640 mg Palmitinsäure wurden in 1 ml Methanol gelöst.

Palmitat-Testmedium (100 μ M): 100 μ l Palmitinsäure-Stammlösung wurden zu 100,0 ml Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

14) 2-Bromopalmitinsäure (Fa. Aldrich, Deutschland), Mr = 335,33 g/mol:

2-Bromohexadecansäure-Stammlösung (100 mM): 33,530 mg 2-Bromohexadecansäure wurden in 1ml Methanol gelöst.

2-Bromohexadecansäure-Testmedium (100 μ M): 100 μ l 2-Bromohexadecansäure-Stammlösung wurden 100,0 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers zugefügt.

15) CCCP = Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (Fa. Sigma), Mr = 204,60 g/mol:

CCCP-Stammlösung (20 mM): 4,092 mg CCCP wurden in 1 ml DMSO gelöst.

CCCP-Testmedium (5 μ M): 2,5 μ l CCCP-Stammlösung wurden 10,0 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers zugefügt.

16) Oligomycin (Fa. Sigma, Deutschland), Mr = 791,10 g/mol:

Oligomycin-Testmedium (5 μ M): 3,900 μ g Oligomycin wurden in 1 ml DMSO gelöst.

3.1.3 Kontrollmedien

1) Glucose (Fa. Merck, Deutschland), Mr = 198,17 g/mol:

Kontrollmedium A (10 mM): 198,170 mg Glucose wurden in 100,0 ml KR-Puffer gelöst.

Kontrollmedium B (5 mM): 99,100 mg Glucose wurden in 100,0 ml KR-Puffer gelöst.

Kontrollmedium C (3 mM): 59,500 mg Glucose wurden in 100,0 ml KR-Puffer gelöst.

2) KCl (Fa. Merck, Deutschland), Mr = 74,96 g/mol:

Kaliumchlorid-Kontrollmedium (40 mM): 29,980 mg Kaliumchlorid wurden in 10,0 ml eines Glucose-haltigen KR-Puffers gelöst.

3) NAD(P)H (Fa. Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland), Mr = 709,40 g/mol:

Kontrollmedium A (20 mM): 14,190 mg NAD(P)H wurden in 1,0 ml bidest. Wasser gelöst.

Kontrollmedium B (10 mM): 7,100 mg NAD(P)H wurden in 1,0 ml bidest. Wasser gelöst.

Kontrollmedium C (5 mM): 3,550 mg NAD(P)H wurden in 1,0 ml bidest. Wasser gelöst.

Kontrollmedium D (1 mM): 0,710 mg NAD(P)H wurden in 1,0 ml bidest. Wasser gelöst.

3.1.4 Stamm- und Inkubationsmedien der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

1) **Fura-2/AM (Fa. Mobitec, Göttingen, Deutschland), Mr = 1001,86 g/mol:**

Fura-2/AM-Stammlösung (1 mM): Es wurden 50,0 µg Fura-2/AM in 50 µl DMSO gelöst.

Fura-2/AM-Inkubationsmedium (2 µM): Es wurden 2 µl der Fura-2/AM-Stammlösung zu 998 µl Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

2) **Fura-PE3/AM (Fa. Mobitec, Göttingen, Deutschland), Mr = 1258,0 g/mol:**

Fura-PE3/AM-Stammlösung (1 mM): Es wurden 0,5 mg Fura-PE3/AM in 397 µl DMSO gelöst und zu je 50 µl Stammlösung in Vials portioniert.

Fura-PE3/AM-Inkubationsmedium (2 µM): Es wurden 2 µl der Fura-PE3/AM-Stammlösung zu 998 µl Glucose-haltigem KR-Puffer pipettiert.

3) **a.) Fluo-3/AM (Fa. Mobitec, Göttingen, Deutschland), Mr = 1129,86 g/mol:**

Fluo-3/AM-Stammlösung (1 mM): Es wurden 1,0 mg Fluo-3/AM in 885 µl DMSO gelöst und zu je 50 µl Stammlösung in Vials portioniert.

b.) Pluronic® F-127 (Eugene, Oregon, USA), Mr = 1250,0 g/mol:

Pluronsäure-Stammlösung (200 mM): Es wurden 62,5 mg Pluronic® F-127 in 250 µl DMSO gelöst.

Fluo-3/AM-Inkubationsmedium (2 µM): Es wurden den 2 µl der Fluo-3/AM-Stammlösung 997 µl des Glucose-haltigen KR-Puffers zugefügt. Des weiteren wurden noch 1 µl Pluronsäure-Stammlösung (0,2 mM) in die Lösung pipettiert.

3.1.5 Kulturmedien für die Pankreasinselisolierung

3.1.5.1 RPMI - Medien für die Zellkultur

Die ersten zwei Stunden in der Zellkultur wurden die Pankreasinseln mit RPMI-Medium versetzt, das 10 mM Glucose enthielt, was in Anlehnung an die Beobachtung geschah, dass auch einzelne B-Zellen an der Zellkulturschale (NuncloTM Surface, Nunc) bei 10 mM Glucose - und nicht bei 5 mM Glucose - besser anwachsen konnten. Für 1 Liter zu verwendende Lösung wurden 10,420 g RPMI (Seromed, Cat No. T 121-10, w L-Glutamine), 1,982 g Glucose und 2,000 g NaHCO₃ (Merk) in 0,9 l bidest. Wasser gelöst. Penicillin und Streptomycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 IU/ml Penicillin (Biochrom AG) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG) auf ein Volumen von 1 l bezogen ergänzt.

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde der Ansatz sterilfiltriert und in Einzelportionen zu 100 ml abgefüllt und bei 2°C bis 8°C gelagert. Diesen Einzelportionen wurden vor Gebrauch 10 ml Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories, Pasching) zugegeben. 100 ml RPMI-Medium enthielten demnach 10 % FCS. Bei den Pankreasinseln war es normalerweise der Fall, dass sie nach der zweistündigen Ruhephase in der RPMI-Lösung, versetzt mit 10 mM Glucose, noch nicht ausreichend fest angewachsen waren (s. Kapitel 3.1.8.2). Die Anwachsphase dauerte bis zu 24 h und wurde im RPMI-Medium, versetzt mit 5 mM Glucose, fortgeführt. Vorteil war, dass eine solche Glucosekonzentration keine Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln bewirkte. Für 1 Liter der zu verwendenden Lösung wurden 8,440 g RPMI 1640 (Gibco BRL, WIE 074-01800, w L-Glutamine), 0,991 g Glucose und 2,000 g NaHCO₃ (Merk) in 0,9 l bidest. Wasser gelöst. Penicillin und Streptomycin wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 IU/ml Penicillin (Biochrom AG) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG) auf ein Volumen von 1 l bezogen ergänzt. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,2 wurde der Ansatz sterilfiltriert und in Einzelportionen zu 100 ml abgefüllt und bei 2°C bis 8°C gelagert. Diesen Einzelportionen wurde vor Gebrauch 10 ml Kälberserum (FCS) (PAA Laboratories, Pasching) zugegeben. 100 ml RPMI-Medium enthielten so 10 % FCS.

3.1.6 Collagenlösung zur Beschichtung von Deckgläsern

Zur Kultivierung von Pankreasinseln auf Deckgläsern (Menzel-Gläser; Ø 25 mm; Stärke 1: 0,13 bis 0,17 mm), wurde jedes Glasplättchen mit einer Collagenlösung beschichtet (s. Kapitel 3.1.8.2). Zur Herstellung von 2 ml Collagenlösung wurden 1 mg Collagen vom Typ 1 (C7661; Fa. Sigma) in einem sterilisierten Schraubdeckelgefäß abgewogen. Als Lösungsmittel diente eine 0,2prozentige Essigsäure, welche direkt vor Zugabe mittels eines Sterilfilters (Filtropur S plus 0,2, Fa. Sarstedt) sterilfiltriert wurde (Lenzen et al., 2000). Anschliessend wurde das Collagen vom Typ 1 im Ultraschallbad gelöst. Es konnte ca. vier Wochen bei einer Lagertemperatur von 4°C verwendet werden.

3.1.7 Versuchstiere

Es wurden Albinomäuse des Stammes NMRI aus einer selektiven Auszucht (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln) verwendet. Die zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate verwendeten Pankreasinseln entstammten männlichen oder weiblichen Albinomäusen im Alter von 9-12 Wochen. Die Langerhans'schen Inseln, die zur Bestimmung der cytosolischen Ca²⁺-

Konzentration und der NAD(P)H-Konzentration verwendet worden sind, entstammten dagegen nur weiblichen Albinomäusen im Alter von 12-15 Wochen. Das Gewicht aller NMRI-Mäuse betrug durchschnittlich 25 g, sie wurden bei Raumtemperatur von 25°C und 70-80 % Luftfeuchtigkeit gehalten und hatten freien Zugang zu Trinkwasser und einem Standard-Diätfutter (Altromin 1324, Fa. Altromin). Das Futter wurde vor der Entnahme des Pankreas nicht abgesetzt.

3.1.8 Gewebegewinnung und Zellkultur

3.1.8.1 Pankreasinselisolierung

Die in diesem Kapitel vorgestellten zwei Verfahren wurden zur Isolierung aller Langerhans'schen Inseln eingesetzt, die für die Perfusionen verwendet wurden, sei es zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate, der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration oder der NAD(P)H-Konzentration der Pankreasinseln. Diese zwei verschiedenen Methoden der Inselisolierung aus dem Pankreasgewebe sind 1.) das „konventionelle“ Collagenase - Digestionsverfahren (Moskalewski, 1965; Lacy und Kostianovsky, 1967; Lernmark 1974), bei dem das Pankreas erst nach der Entnahme aus der getöteten Maus mit der Collagenaselösung versetzt wird und 2.) das Collagenase-Digestionsverfahren, bei dem in das Pankreas bereits vor der Entnahme aus der getöteten Maus die Collagenaselösung injiziert wird (Gotoh et al., 1985; Zimny et al., 1993).

Zur Durchführung beider Verfahren mussten zunächst die gebrauchsfertigen Basis- und Kulturmedien sowie das Schüttelwasserbad (ST1-338, Fa. Bühler) eine Temperatur von 37°C aufweisen. Sodann wurde eine NMRI-Maus per Dekapitierung getötet. Das Fell wurde mit Ethanol (70 %) desinfiziert und die obersten Hautschichten mit samt dem Fell und die darunterliegende Muskulaturetschicht nach erneuter Desinfektion aufgetrennt und zur Seite geklappt.

Nach dem Verfahren der „konventionellen“ Collagenase-Digestion wurde die Bauchspeicheldrüse dann zügig und vollständig exzidiert. Das entnommene Pankreas wurde in einem Schraubdeckelgefäß überführt, welches 2 ml Basismedium (s. Kapitel 3.1.1) mit 5 mM Glucose beinhaltete. Bevor die eigentliche Collagenase-Andauung eingeleitet werden konnte, wurde das Gewebe von anhängendem Fettgewebe befreit, da es den Verdauungsprozess nachteilig beeinflussen konnte. Das Pankreas wurde nachfolgend ca. vier Minuten lang in 2 ml KR-Puffer (s. Kapitel 3.1.1), versetzt mit 5 mM Glucose, mit einer Schere in sehr kleine Stücke zerteilt. Es folgte die Überführung dieses feinzerteilten Gewebes in

ein Schraubdeckelgefäß, welches genau 1 mg Collagenase (Collagenase P, Fa. Boehringer Mannheim) enthielt. Dieses Schraubdeckelgefäß wurde sodann in dem Schüttelwasserbad befestigt und mit einer Frequenz von 328/min bei 37°C geschüttelt. Das stellte die eigentliche Collagenase-Andauung des Pankreas dar. Von Nachteil war, dass bei diesem Verfahren eine Schädigung der Pankreasinseln durch die mechanische Zerkleinerung des pankreatischen Gewebes und durch die lysierende Enzymaktivität der Collagenase stattfinden konnte. Zur Minimierung dieser Fehlerquelle wurde möglichst zeitpräzise gearbeitet. So erfolgte die Unterbrechung des Verdaus genau nach 7.30 Minuten. Die Pankreasinseln wurden dann durch kräftiges Schütteln per Hand (ca. 10 sec.) aus dem Gewebe extrahiert. Die eigentliche Unterbrechung der Collagenase-Andauung stellte das sofortige Verdünnen mit etwa 5,0 ml des Glucose-haltigen Basismediums (s. Kapitel 3.1.3) dar. Dieses Gemisch musste nun innerhalb von fünf Minuten sedimentieren, um den Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe absaugen und das Gefäß erneut mit dem Glucose-haltigem Basismedium auffüllen zu können. Das angedaute Gewebe wurde in eine Petrischale überführt und es wurde sofort damit begonnen, unter dem Stereomikroskop (Stemi 2000, Fa. Zeiss) diejenigen Pankreasinseln, die frei von Gewebe waren, aus der Lösung zügig herauszupipettieren. Die übrigen Langerhans'schen Inseln mussten dann noch innerhalb von ca. 30 Minuten von dem exokrinen Gewebe mit Hilfe zweier geschliffener Kanülen befreit werden und konnten dann aus der Lösung herauspipettiert werden. Oberstes Ziel dieser Präparationsmethode war es, eine möglichst grosse Anzahl gewebefreier und intakter Pankreasinseln zu erhalten. Pro Maus konnten mit dieser Methode durchschnittlich 100 Langerhans'sche Inseln gewonnen werden, welche dann dreimal mit dem Glucose-haltigen KR-Puffer gewaschen wurden. Zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate wurden 50 möglichst freie und mikroskopisch einwandfreie Langerhans'sche Inseln direkt im Anschluss umströmt (s. Kapitel 3.2.1). Die zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der NAD(P)H-Konzentration eingesetzten einzelnen Pankreasinseln wurden wie unter Kapitel 3.1.8.2 beschrieben kultiviert.

Zur Vorbereitung des Collagenase-Digestionsverfahrens nach Gotoh et al. (1985) mussten 3 mg Collagenase (Collagenase P, Fa. Boehringer Mannheim) in 3 ml KR-Puffer aufgelöst werden. Diese Lösung wurde in eine 2-ml-Plastikspritze (Injekt, Braun) überführt, die Spitze dieser Spritze mit einer sterile Kanüle (BD Microlance™ 3, 0,3 x 13, Luer-Lock, 30GA 0,5) versehen und dann eisgekühlt. Nach Dekapitation der Maus wurde die Bauchhöhle wie beschrieben geöffnet. Die Maus wurde dann auf einem Klemmbrett so fixiert, dass der Körper der Maus kaudal vom Präparator wegwies. Unter dem Mikroskop wurde die Mündung des Gallengangs (Ductus choledochus) in den Zwölffingerdarm mit einer Gefässklemme

abgeklemmt und dann wurde die gekühlte Collagenase in den gespannten Gallengang injiziert unter der Kontrolle, dass die Lösung retrograd über den Ductus pancreaticus das Pankreas auffüllte, so dass dieses anschwell. Dann konnte das Pankreas mit Hilfe von sterilisierten Pinzetten herausgenommen werden und in ein 10-ml-Plastikschraubdeckelgefäß (Sarstedt) überführt werden, das wiederum eisgekühlt war. Dieses Gefäß wurde dann für 20 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C gestellt, um den Verdau einzuleiten. Mit 5 ml kaltem KR-Puffer wurde der Verdau dann beendet. Sodann wurde das angedaute Pankreas 15 Sekunden bei 300 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und nochmals mit KR-Puffer aufgefüllt und wieder zentrifugiert und abgesaugt. Das angedaute Pankreas wurde dann mit KR-Puffer aufgefüllt und in eine Petrischale überführt. Die Pankreasinseln wurden gesammelt, wobei den hier gewonnen Langerhans'schen Inseln beachtlich weniger exokrines Gewebe anhaftete. Dieses „Injektionsverfahren“ hatte im Vergleich zum „konventionellen“ Collagenase-Digestionsverfahren drei Vorteile:

- 1.) Es konnten wesentlich mehr Langerhans'sche Inseln aus dem Pankreas gewonnen werden (bis zu durchschnittlich 250 Langerhans'sche Inseln/pro Pankreas der Maus).
- 2.) Die Pankreasinseln wurden während dieses Isolierungsverfahrens weniger stark beansprucht, da die mechanische Zerkleinerung des pankreatischen Gewebes und die manuelle Entfernung von exokrinem Gewebe weitgehend ausblieb.
- 3.) Die Dauer des Anwachsens der Pankreasinseln auf den Deckgläschen (s. Kapitel 3.1.8.2) verkürzte sich im Vergleich zu der Dauer des Anwachsens der Langerhans'schen Inseln, die nach dem „konventionellen“ Collagenase-Digestionsverfahrens gewonnen wurden, wesentlich (12-24 h versus 48-72 h).

Diesen Vorteilen stand aber vermutlich ein Nachteil gegenüber (s. Diskussion, Kapitel 5.1.1). Die so gewonnenen Pankreasinseln wurden dann zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der NAD(P)H-Konzentration wie in Kapitel 3.1.8.2 beschrieben kultiviert oder zur Bestimmung der Insulinsekretion wie in Kapitel 3.2. beschrieben direkt vermessen.

3.1.8.2 Kultivierung isolierter Langerhans'scher Inseln der Maus

Zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der NAD(P)H-Konzentration wurden die Pankreasinseln im Anschluss an den Verdau auf hitzesterilisierten Glasplättchen kultiviert. Die nachfolgend beschriebene Beschichtung wurde in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Glasplättchen (Menzel-Gläser; Ø 25 mm; Stärke 1), die während der Perfusionen als Träger der Pankreasinseln dienten und auf denen diese anwachsen sollten, wurden unter der sterilen Werkbank in den Petrischalen mittig positioniert und dann mit je

1 μ l Collagenlösung (s. Kapitel 3.1.6) hauchdünn beschichtet, wobei eine vorher markierte Fläche in der Mitte des Deckgläschens gleichmässig ausgestrichen wurde (Lenzen und Peckmann, 2001). Im Anschluss daran mussten die beschichteten Glasplättchen in der sterilen Werkbank ca. 10 Minuten trocknen. Die Langerhans'schen Inseln, die - wie in Kapitel 3.1.8.1. beschrieben - gewonnen worden sind, wurden vor der Transferierung auf die vorbereiteten Glasplättchen einmal im KR-Puffer (s. Kapitel 3.1.1), versetzt mit 5 mM Glucose und zweimal in dem RPMI-Nährmedium (s. Kapitel 3.1.5.1), versetzt mit 10 mM Glucose und fetalem Kälberserum (10% (v/v)), gewaschen. Dann wurde je eine einzelne Pankreasinsel in einem Volumen von 100 μ l RPMI-Nährmedium (mit 10 mM Glucose) auf je ein beschichtetes Glasplättchen transferiert. Es folgte dann eine Inkubation dieser Pankreasinseln in einem Brutschrank über einen Zeitraum von 1,5 - 2 h bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 Volumen - %. Direkt im Anschluss an diese Ruhephase wurde das RPMI-Nährmedium, das mit 10 mM Glucose versetzt war, in jeder Petrischale unter sterilen Bedingungen gegen ein RPMI-Nährmedium, das 5 mM Glucose enthielt (s. Kapitel 3.1.5.1), ausgetauscht. Die eigentliche Kultivierungsphase wurde so in 2,5 ml RPMI 1640 - Lösung, versetzt mit 5 mM Glucose und fetalem Kälberserum (10% (v/v)) durchgeführt. Innerhalb von 12-24 h („Injektionsverfahren“) bzw. 48-72 h („konventionelles“ Collagenase-Digestionsverfahren; s. Kap. 3.1.8.1) waren die Pankreasinseln mittig auf dem collagenbeschichteten Deckgläsern angewachsen und konnten für die verschiedenen Umströmungen verwendet werden.

3.2 Insulinsekretionsmessung

3.2.1 Perifusion isolierter Langerhans'scher Inseln der Maus

Die Perifusionen wurden mit dem 1977 von Panten et al. beschriebenen Mikroperifusionssystem durchgeführt (s. Abb. 3.1.). Zur Gewährleistung einer konstanten Temperatur von 37°C während der gesamten Dauer der Umströmung wurde der Perifusionsapparat ca. 90 Minuten vor Beginn vorgeheizt. Ausserdem war eine während des gesamten Experiments zu erfolgende fortlaufende Durchströmung mit Carbogen durch den Perifusionsapparat vorgesehen. Die Messzylinder enthielten die je nach experimentellem Protokoll entsprechenden Lösungen. Während des Experiments wurden die Lösungen durch eingeführte Schläuche fortlaufend mit Carbogen begast. Die Vorbereitung der Perifusionskammer erfolgte folgendermassen: In die Rille am Kammerkonus wurde mit einer Deckglaspipette vorsichtig ein Filter (Filtertyp 5 μ m, Ø 13 mm, Fa. Millipore) eingelegt, ohne diesen zu verletzen und ein Silikondichtungsring aufgelegt. Anschliessend wurde der Ableiteteil aufgeschraubt. Die Perifusionskammer wurde dann mit dem KR-Puffer (s.

Kapitel 3.1.3) mit Hilfe einer 5-ml-Spritze, die über einen Kunststoffkonus mit dem Ableiteschlauch verbunden war, aufgefüllt. So war es möglich, 30-50 isolierte Pankreasinseln in die vorbereitete Kammer zu pipettieren und sie langsam auf den Filter sedimentieren zu lassen. Die Begasungsschläuche wurden entfernt und zwei Ansaugschläuche bis auf den Boden der Zylinder eingeführt. Die mit Langerhans'schen Inseln bestückte Perifusionskammer wurde vorsichtig in der Perifusionsapparatur mit Klebeband befestigt, so dass sie direkten Kontakt zur Kammerwand besass, um zu gewährleisten, dass auch in der Perifusionskammer während der gesamten Umströmung eine Temperatur von 37°C herrschte.

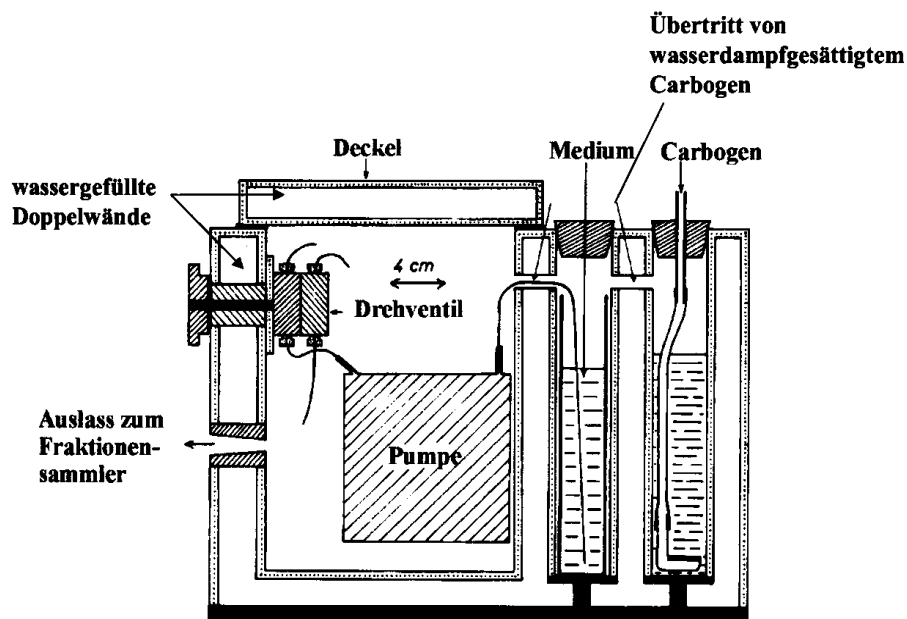


Abb. 3.1. Modell des Mikroperifusionssystems (Seitenansicht) nach Panten et al., 1977. Das System verfügt über doppelte Wände, die von 37°C warmen Wasser durchströmt werden. Zur Durchführung der Experimente wurde eine von der Abbildung abweichende Anordnung der Pumpe benutzt. Diese Pumpe war vor die Perifusionskammer geschaltet (hier nicht dargestellt). Detaillierte Beschreibung s. Text.

Anschliessend wurde das erste Medium über einen Ansaugschlauch mit Hilfe einer 5-ml-Spritze und einem Kunststoffkonus per Hand angesaugt, manuell abgeklemmt und sofort mit dem oberen Teil der Perifusionskammer verbunden. Wichtig war dabei ein luftblasenfreies Schlauchsystem, da sonst die Perifusionskammer sehr schnell trocken laufen konnte. Die am Ableiteschlauch befindliche 5-ml-Spritze wurde entfernt und der Schlauch am Fraktionssammler (Cygnat, Fa. Isco, USA) justiert. Dieser wurde dann mit der Pumpe (Multiperpex®, Fa. LKP) zur gleichen Zeit in Betrieb genommen und damit der Versuch gestartet. Die Fliessgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Bevor eine Testsubstanz die Pankreasinseln umströmte, wurden diese 40 Minuten lang mit dem Kontrollmedium

umströmt. Das experimentelle Protokoll variierte je nach dem erwünschten Ziel (s. Ergebnisteil). Jeweils 1 ml des Perifusats wurde nach der Umströmung in Eppendorf-Reagenzgefäßen bis zur Verwendung im Elisa-Test tiefgefroren.

Nach Beendigung der Umströmung wurde die Perifusionskammer aus der Apparatur entfernt, geöffnet und der Filter mit den Pankreasinseln beseitigt. Die Kammer und der Dichtungsring wurden mit bidest. Wasser sorgfältig gereinigt und dann an der Luft über Nacht getrocknet. Das Schlauchsystem wurde dann manuell mit bidest. Wasser durchspült und vor jedem Wechsel der Testsubstanz zusätzlich vor der Spülung mit bidest. Wasser noch mit Ethanol 70 % gereinigt. Gegebenfalls wurden die Apparatur mit Ethanol 70 % von aussen und innen gereinigt.

3.2.2 Bestimmung des Insulingehaltes

Der Insulingehalt der Proben wurde mit Hilfe eines enzymatischen Immunassays (ELISA) bestimmt (RAT Insulin ELISA, Fa. Mercodia, Uppsala, Schweden). Dieser Test basierte auf dem sog. Sandwich-Prinzip: Das Insulin aus der Probe band an einem in der Mikrotiterplatte vorhandenen monoklonalen Insulinantikörper. Diesem Inkubationsansatz wurde ein zweiter monoklonaler Insulinantikörper, der mit dem Enzym Peroxidase konjugiert war, zugefügt. Dieser band an eine andere antigene Determinate des Insulinmoleküls (= „Sandwich“). Dieser Ansatz wurde sodann zwei Stunden im Schüttelinkubator (SLT IS 2.10, Fa. SLT) inkubiert. Anschliessend wurden die ungebundenen Anteile des markierten Antikörpers durch mehrmaliges Waschen entfernt. Das dann zupipettierte Substrat 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidin oxidierte dann unter Einwirkung der Peroxidase zu einer farbigen Verbindung, so dass die Detektion des markierten Antikörpers bzw. des gebundenen Insulins möglich war. Die Absorption der entstandenen Verbindung wurde UV-spektroskopisch bei $\lambda=450$ nm bestimmt (Photometer, Fa. Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg) und war proportional zur Insulinkonzentration. Durch Erstellung einer Standardkurve und Nutzung des Prism-Programms (GraphPad, San Diego, USA; Version 3.1) konnte der Insulingehalt der Proben bestimmt werden. Zur Erstellung der Standardkurve wurden Insulinstandards im Konzentrationsbereich von 0 bis 5,5 µg/l parallel mit den Proben inkubiert.

3.2.3 Datenauswertung

Mit Hilfe des Prism-Programms (GraphPad, San Diego, USA) erfolgte eine Umrechnung der gemessenen Insulinkonzentrationen mit der Einheit [µg/l] in die Einheit [pg/min x Insel].

Derjenige Insulingehalt, der unmittelbar vor dem Umschalten auf das jeweilige Testmedium ermittelt wurde, wurde als relative Sekretionsrate auf 100 % gesetzt und alle anderen ermittelten Insulinkonzentrationen auf diesen Wert bezogen. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte der relativen Sekretionsraten in % oder als arithmetische Mittelwerte der absoluten freigesetzten Insulinmengen in pg/min x Insel \pm SEM für n unabhängige Tests in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

3.3 Mikrofluorimetrische Messung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus

3.3.1 Aufbau der Messvorrichtung

Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus wurde in dieser Arbeit sowohl mit dem 2λ -Verfahren als auch mit dem 1λ -Verfahren durchgeführt, wobei aber die grössere Anzahl der Experimente mit dem 2λ -Verfahren durchgeführt worden ist. Mit dem 2λ -Verfahren kann die Fluoreszenz eines Farbstoffs nach Excitation mit zwei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen werden. Es bietet den entscheidenden Vorteil, ratiometrische Fluoreszenzmessungen durchführen zu können, so dass der Quotient R zweier Fluoreszenzintensitäten (F_1 und F_2) gebildet werden kann. Die auf diese Weise ermittelte Fluoreszenzintensität ist so nur von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig und unabhängig von der Indikatorkonzentration und dem Messvolumen. Voraussetzung ist die Wahl des richtigen Fluoreszenzfarbstoffes. Für das 2λ -Verfahren werden Indikatoren eingesetzt, deren Anregungsspektren sich nach Bindung des Liganden Ca^{2+} an den Farbstoff zu anderen Wellenlängen hin verschieben („shift“). Als solcher Fluoreszenzfarbstoff eignete sich für die Experimente in dieser Arbeit insbesondere der für cytosolische Ca^{2+} -Konzentrationsbestimmungen etablierte Fluoreszenzindikator Fura-2/AM (Grynkiewicz et al., 1985). Mit Hilfe des von der Firma Leitz hergestellte „Orthoplan“-Mikroskop konnte eine für ratiometrische Fluoreszenzmessungen notwendige Excitation des Indikators Fura-2/AM bei zwei verschiedenen Wellenlängen (340 nm und 380 nm) gewährleistet werden. Die Verwendung von Fura-2 als Fluoreszenzindikator (s. Kapitel 3.3.2.1) stellt aber auch hohe Anforderungen an die Erzeugung des Anregungslichtes: 1. Die Fluoreszenzintensität ist in entscheidender Weise von der Anregungswellenlänge abhängig. 2. Pro Messzeitpunkt werden kurz aufeinanderfolgend zwei verschiedene Wellenlängen benötigt, d.h. die Probe muss mit Licht alternierender Wellenlänge angeregt werden (Excitation-Ratioing).

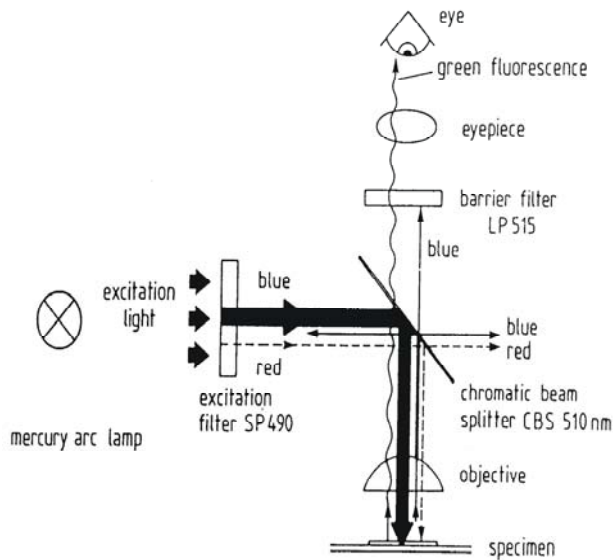


Abb. 3.2.: Strahlengang durch das Epi-fluoreszenzmikroskop (Ploem, 1993). Als Lichtquelle wurde hier nicht eine Quecksilber - Hochdruckgasentladungslampe genutzt, sondern eine Xenonlichtbogenlampe verwendet. Des weiteren erfolgte die Erzeugung monochromatischen Lichtes nicht (wie hier dargestellt) über einen Excitationsfilter, sondern über ein optisches Gitter (nähere Erläuterung im Text).

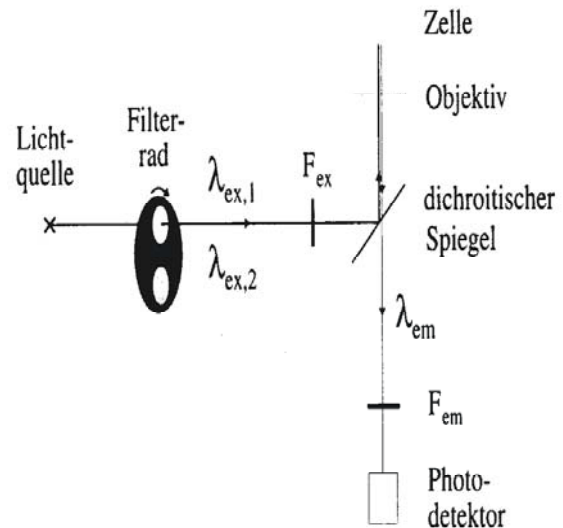


Abb. 3.3.: Messverfahren mit zwei alternierenden Excitationswellenlängen (Ploem, 1993). Die alternierenden Wellenlängen wurden nicht wie hier dargestellt mit Hilfe eines Filterrads projiziert, sondern mittels schwingender Spiegel, die jeweils einen Ausschnitt aus dem Spektrum der Xenonlampe auf zwei verschiedene Quarzfaserlichtleiter projizierten (nähere Erläuterung im Text).

Diese Voraussetzungen konnten durch die Verwendung einer leistungsstarken Hochdruckgasentladungslampe, der Xenonlichtbogenlampe, als Mikroskoplichtquelle und zweier verschiedener Quarzfaserlichtleiter realisiert werden. Die Xenonlichtbogenlampe enthält in ihrem Emissionsspektrum die Anregungswellenlängen des Fluorophors Fura-2 und stellt eine nahezu konstante Fluoreszenzanregung sicher, weil das Spektrum der Xenonlichtbogenlampe eine relativ konstante Strahlungsintensität in dem Wellenlängenbereich von ungefähr 300 nm bis 650 nm aufweist. Durch die Projektion der Anregungsstrahlung auf zwei verschiedene Quarzfaserlichtleiter konnte die notwendige Excitation des Indikators Fura-2 bei zwei verschiedenen Wellenlängen gewährleistet werden. Eine zeitgesteuerte Öffnung mit einer einminütigen Taktfrequenz, die dem Erregerlicht den Strahlengang auf ein Beugungsgitter ermöglichte, konnte durch zwei programmierbare Schnellverschlüsse (Uniblitzz-Shutter mit Kontrolleinheit VMMD-1), die als Verschluss der Quarzfaserlichtleiter dienten, realisiert werden. Das Beugungsgitter wiederum diente als Monochromator, an dessen Gitterkanten das breite Spektrum des von der Xenonlampe

erzeugten Lichtes reflektiert bzw. gebeugt wurde und so in die einzelnen Wellenlängen aufgespalten wurde. Die jeweils gewählte Wellenlänge (das monochromatische Licht) wurde dann wiederum in den aus dem Beugungsgitter führenden Quarzfaserlichtleiter geleitet. Der Lichtleiter wurde direkt in das Lampenhaus des Epifluoreszenzmikroskops eingekoppelt. Insofern stand monochromatisches Licht, d.h. Licht einer einzigen Wellenlänge, für die Excitation der Ca^{2+} -Chelatkomplexe zur Verfügung, in diesem Fall Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm und Licht bei einer Wellenlänge von 380 nm. Das monochromatische Anregungslicht erreichte so das Mikroskop und traf auf einen dichroitischen Strahlenteiler (auch dichromatischer Teilerspiegel bzw. „chromatic beam-splitter“, abgekürzt CBS). Die auf dem Prinzip des Stoke'schen Gesetzes basierende Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht konnte mit Hilfe dieses dichromatischen Teilerspiegels aus folgenden Gründen modifiziert werden: 1. Der dichroitische Spiegel war oberhalb des Objektes in einem 45°-Winkel im Strahlengang montiert und das monochromatische Excitationslicht (340 nm bis 380 nm) wurde dadurch um 90° in Richtung auf das Objekt umgelenkt, was die Trennung zwischen Anregungs- und Fluoreszenzlicht unterstützte. 2. Dieser Beam-Splitter reflektierte Licht kurzwelliger Strahlung (< 500 nm, d.h. das Anregungslicht der Fluoreszenz) und liess längerwelliges Licht (> 500 nm, d.h. das Emissionslicht der Fluoreszenz) passieren, so dass das durch das Fura-2 erzeugte Fluoreszenzlicht von 510 nm Wellenlänge den dichroitischen Spiegel passieren konnte und gleichzeitig verhindert wurde, dass das Anregungslicht zum Detektor strahlte. Des weiteren zeichnete sich das 2λ -Mikroskop durch eine hohe Variabilität der einzelnen Module wie zum Beispiel einer möglichen Wahl verschiedener Farbteilerspiegel aus. Es konnte sowohl als Durchlichtmikroskop als auch als Auflicht- bzw. Epifluoreszenzmikroskop verwendet werden. Der entscheidende prinzipielle Vorteil der Epifluoreszenzmikroskopie war die Verwendung eines einzigen Linsensystems, welches als optisches System gleichzeitig die Fokussierung der Anregungsstrahlung auf das Objekt (Kondensorfunktion) als auch die Kollektion der emittierten Fluoreszenzstrahlung (Objektiv) gewährleistete. Auf diese Weise konnte das Auftreten von Störlicht reduziert werden. In der folgenden Arbeit wurde dazu ein Zeiss Fluar Objektiv mit 40er Vergrößerung verwendet, dass sich bei einer Wellenlänge von 340 nm durch eine hohe Transmission auszeichnete, so dass nur ein geringfügiger Verlust an emittierter Strahlung eintrat. Als Ölimmersionsobjektiv verwendet konnte die Lichtsammelkraft des Linsensystems und die Auflösung entscheidend verbessert werden und eine nahezu konstante Temperatur von 37°C direkt in der Durchflusskammer gewährleistet werden (nähere Erläuterung in Kapitel 3.5).

Als bildgebender Detektor fungierte schliesslich die slow scan CCD-Kamera (charge coupled

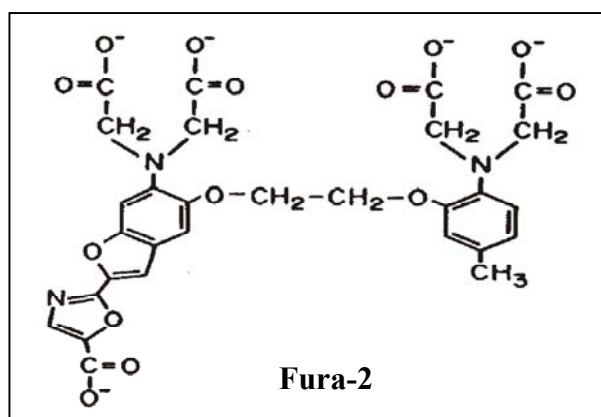
devices). Sie enthielt auf dem intrigierten CCD-Chip feldartig angeordnete Ladungsspeicherzellen (sog. Pixel), welche die eintreffenden Photonen der Fluoreszenzstrahlung registrierten und in einen diskreten Impuls transformierten. Die pro Speicherzelle berechnete Fluoreszenz-Ratio (Pixel-pro-Pixel-Division) wurde dann in adäquate Bildelemente umgesetzt, die in ihrer Gesamtheit die grün fluoreszierenden regions of interest (ROI's) darstellten. Die Kinetik wurde dann durch den Einsatz eines speziellen Computerprogramms (Fucal, TILL-Photonics) direkt aus den registrierten Ratiowerten erstellt (s. Kapitel 3.5.1).

3.3.2 Fluoreszenz ionensensitiver Farbstoffe

Zur Anregung einer Fluoreszenz müssen bestimmte strukturelle Voraussetzungen wie eine starre räumliche Anordnung der Atome innerhalb eines Moleküls, die in planaren, polycyclischen Aromaten und den annellierten Ringsystemen der Heteroaromaten (Pyridin, Indol, Chinolin, etc.) realisiert sind, oder Molekülstrukturen mit konjugierten Doppelbindungen oder Carbonyl-Bindungen oder Chelatkomplexe mit mehrwertigen Ionen vorliegen. Bei der Fluoreszenzanregung kommt es zu einem direkten Übergang der angeregten Elektronen des π -Elektronensystems ($\pi \rightarrow \pi^*$ -Übergang) bzw. der n-Elektronen freier Elektronenpaare ($n \rightarrow \pi^*$ -Übergang) aus dem untersten Schwingungsniveau $V = 0$ des Elektronenanregungszustandes S_x in den energiearmen Grundzustand S_0 . Die strukturellen Voraussetzungen wurden von allen in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzindikatoren erfüllt.

3.3.2.1 Der Fluoreszenzindikator Fura-2

Mitte der achtziger Jahre gelang es, fluoreszierende Moleküle mit einer hohen Affinität gegenüber bi- und trivalenten Kationen zu entwickeln (Kasten, 1993). Ca^{2+} -sensitive Fluorophore, wie zum Beispiel Indo-1 und Fura-2 sind seit 1985 kommerziell erhältlich.

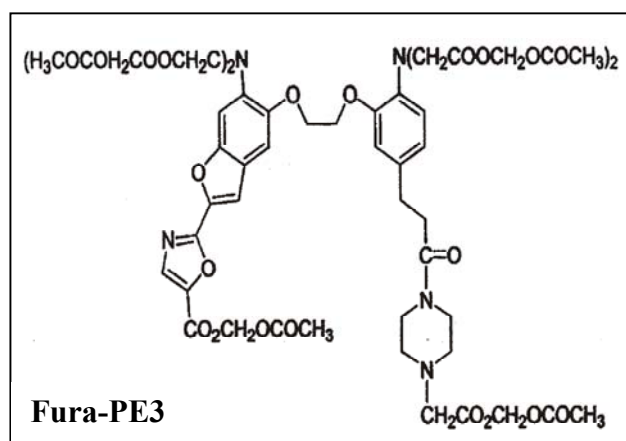


Fura-2 als freie Säure diffundiert nicht mehr aus der Zelle heraus, d.h. die Konzentration des Farbstoffmoleküls in der Zelle übersteigt die Inkubationskonzentration um ein Vielfaches, zumal durch die intrazelluläre AM-Abspaltung der Gradient des AM-Farbstoffes erhalten bleibt. Kritisch zu bewerten ist eine zu lange Inkubationsdauer und eine zu hohe Inkubationskonzentration, da dann die zellulären Esterasen übersättigen. Die AM-Farbstoffmoleküle besitzen dann eine verlängerte Lebensdauer im Cytosol und sind in der Lage, auch intrazelluläre Membranen zu passieren. Eine Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationen der Mitochondrien oder des endoplasmatischen Retikulums wären die Folge.

Wie kann nun die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in intakten Zellen gemessen werden? Fura-2 ist ein hochspezifischer Ca^{2+} -Chelator und ändert bei der Chelierung seine Fluoreszenzeigenschaften, d.h. der Indikator besitzt die Eigenschaft, seine Fluoreszenz in Abhängigkeit von der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu ändern. Bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm liegt ein starker Signalzuwachs mit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor, während bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm eine Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität verbunden ist. Daraus folgt, dass eine verstärkte Bindung des Ca^{2+} -Ions an den Farbstoff mit einer Verlagerung („shift“) des Absorptionsmaximums in kurzwelligere Bereiche verbunden ist. Diese „shift“ ist die Ursache dafür, dass Fura-2 als einer der häufigsten Indikatoren für quantitative Messungen der Ca^{2+} -Konzentration (2λ -Verfahren) eingesetzt wird. Bei 360 nm liegt der sog. isobestische Punkt, hier ist die Fura-Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Konzentration und die Emissionswellenlänge liegt bei 510 nm. Werden die Fluoreszenzintensitäten des Fura-2 bei den Anregungswellenlängen 340 nm und 380 nm quasi gleichzeitig gemessen, ist der Quotient der Intensitäten, die Ratio \mathcal{R} , bestimmt durch die Ca^{2+} -Konzentration der den Farbstoff enthaltenen Lösung. Nach Kalibrierung des Fluoreszenzsignals (s. Kapitel 3.3.2.5) in einem cytosolähnlichen Milieu mit einer Ca^{2+} -freien Lösung (R_{\min}) und einer Lösung mit hoher Ca^{2+} -Konzentration (R_{\max}) bei jeweils gleicher Fura-2-Konzentration kann die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beim gemessenen Fluoreszenzsignal \mathcal{R} anhand der Formel $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$ berechnet werden (Grynkiewicz et al., 1985). Für die anschliessenden Messungen muss die Konzentration des Indikators nicht bestimmt werden, ein Vorteil, der das entscheidende Kriterium für die Wahl von Fura-2 als Indikator für die Ca^{2+} -Konzentration in den Pankreasinseln ist.

3.3.2.2 Der Fluoreszenzindikator Fura-PE3

Die Tendenz, dass der mit Ca^{2+} -Ion gebundene Indikator Fura-2 in bedeutendem Ausmass aus Zellen freigesetzt wurde („leakage“, Jakob et al., 1998; Manzini und Schild, 2002), machte die Entwicklung eines unpolaren Fluoreszenzindikators notwendig. Fura-PE3/AM wurde 1995 von der Arbeitsgruppe um Dr. Poenie in Austin, Texas entwickelt. Als Abkömmling von Fura-2 ist Fura-PE3 ($K_D = 0,25 \mu\text{M}$) ein Ca^{2+} -sensitiver Fluoreszenzindikator und zählt ebenfalls zu den empfindlichsten und populärsten Fluoreszenzindikatoren.



Fura-PE3 enthält ein Piperazinring, dessen Stickstoff mit den benachbarten Carboxylgruppen zur Bildung eines Zwitterions führt. Die unerwünschte Freisetzung des gebundenen Indikators aus der Zelle („leakage“) und die damit verbundene Abnahme der Konzentration des mit dem Ca^{2+} -Ion gebundene Indikators in der Zelle kann durch die Verwendung des Indikators Fura-PE3 minimiert werden (vgl. Abb. 3.4.). Fura-PE3 verbleibt länger in den Zellen.

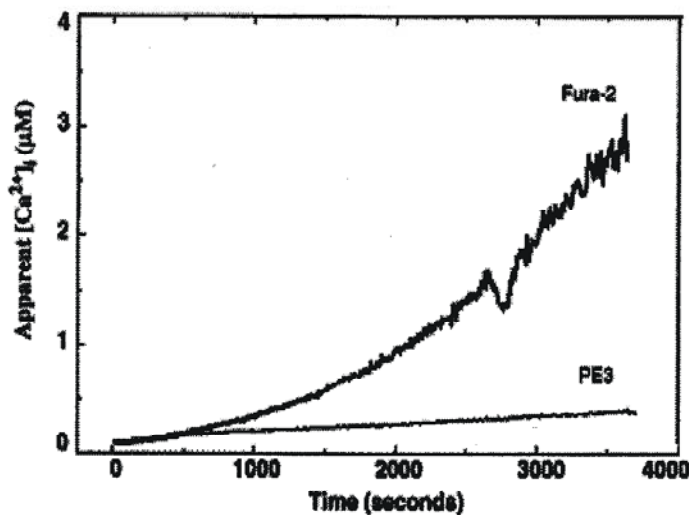


Abb. 3.4.: Graphische Darstellung der unterschiedlich ausgeprägten Freisetzung der mit Ca^{2+} -Ionen gebundenen Indikatoren Fura-2 und Fura-PE3 aus 322 T lymphoma-Zellen (s. website teflab.com, 2001 und Erläuterung im Text).

Da die Anregungswellenlänge und die Emissionswellenlänge nach Hydrolyse mit denjenigen des Fura-2 identisch sind, ist es möglich, dass Fura-PE3/AM den Fluoreszenzindikator Fura-2/AM ohne zusätzlichen technischen Aufwand ersetzen kann.

3.3.2.3 Der Fluoreszenzindikator Fluo-3

Fluo-3/AM wurde im Jahre 1982 von der Arbeitsgruppe Tsien synthetisiert. Wesentliche optische Eigenschaft von Fluo-3 bei Kontakt mit Ca^{2+} -Ionen ist eine starke Zunahme der Quanteneffizienz des Fluorophors (40 x). Eine Verlagerung der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge nach Ca^{2+} -Ionenbindung („shift“) bleibt aber aus, eine ratiometrische Fluoreszenzmessung ist deshalb nicht sinnvoll (Grynkiewicz, et al., 1985). Ein Vorteil von Fluo-3 ist, dass die Anregung im langwelligen sichtbaren Bereich liegt, was weniger anspruchsvolle optische Elemente erfordert (Filterwürfel I3, Fa. Leitz, 513719; RKB 510 nm; LP ab 520 nm) und die Zellen weniger beansprucht. Demgegenüber stehen aber auch zwei wesentliche Nachteile: 1. Die bereits erwähnte fehlende Möglichkeit der ratiometrischen Fluoreszenzmessung und 2. der sehr schmale Wellenlängenbereich zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge ($A_{\text{max}} = 490 \text{ nm}$; $E_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$).

3.3.2.4 Die Beladung der Pankreasinseln mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen

Die Konzentration der Fluoreszenzfarbstoffe im Inkubationsmedium sollte einerseits nicht zu hoch sein, da es dann zur Pufferung des Ca^{2+} -Ions und zur Schädigung der B-Zellen durch Abbauprodukte der Esterhydrolyse kommt („Quenching“). Andererseits hat eine zu niedrige Konzentration sehr geringe Fluoreszenzsignale zur Folge. Fluoreszenzindikatoren hoher Absorptionsfähigkeit und hoher Quanteneffizienz können somit zur Optimierung der Messungen beitragen.

Nach einer Kultivierungsdauer von 12 h bis 72 h (s. Kapitel 3.1.8.2) erfolgte die Beladung der Langerhans'schen Inseln direkt vor den Experimenten. Die folgenden Kriterien waren für die Auswahl der kultivierten Pankreasinseln, die dann für die Experimente verwendet und mit den entsprechenden Testmedien perfundiert wurden, entscheidend: 1. Die Pankreasinsel musste weitgehend in der Mitte des Deckgläschens angewachsen sein. 2. Sie musste fest angewachsen sein. 3. Sie musste frei von exokrinem Gewebe sein (Abb. 3.5.). 4. Die Pankreasinseln sollten rundlich sein und von einer dünnen Kapsel umhüllt sein (Abb. 3.5.). 5. Sie sollten möglichst einen kleinen Durchmesser aufweisen (Gilon et al., 1994; Ravier et al., 2002; s. auch Diskussion, Kapitel 5.1.1 und Abb. 3.5.).

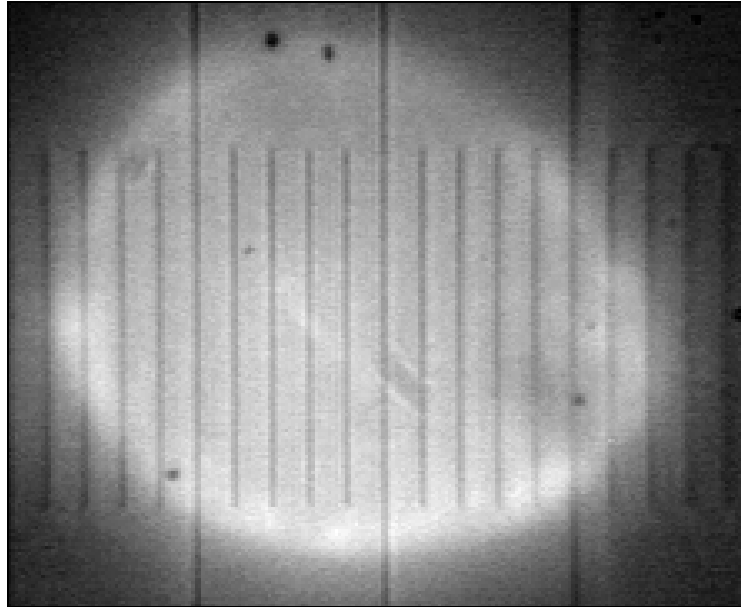


Abb. 3.5.: Grösse einer kultivierten Pankreasinsel (Kombination von Durchlicht und Fluoreszenz). Die durchschnittliche Grösse der umströmten kultivierten Langerhans'schen Inseln lag bei 100-300 μm . Zur Skalierung: 1 Skalenteil des Objektmikrometers entspricht 10 μm .

Das Kulturmedium in den mit auf Deckgläschen angewachsenen Pankreasinseln enthaltenen Petrischalen wurde durch die folgenden Inkubationsmedien, abhängig von der Wahl des Indikators, ersetzt:

- a.) **Fura-2/AM**: Es wurden 995 μl KR-Puffer (5 mM Glucose), dem zuvor 2 μl des in DMSO gelösten Fura-2/AM zugesetzt worden war (s. Kap. 3.1.4), als Inkubationsmedium erforderlich, die Endkonzentration des Fura-2/AM betrug demnach 2 μM . Die Beladungsdauer bei 37°C betrug 45 min (Lenzen und Peckmann, 2001).
- b.) **Fura-PE3/AM**: Es wurden 995 μl KR-Puffer (5 mM Glucose) benötigt, dem zuvor 2 μl der Fura-PE3/AM-Stammlösung (s. Kap. 3.1.4) zugefügt worden war. Die Endkonzentration des Fura-PE3/AM-Inkubationsmediums betrug 2 μM . Die Beladungsdauer bei 37°C betrug 90 min (Ravier et al., 2002; Kjems et al., 2002).
- c.) **Fluo-3/AM**: Es wurden 997 μl KR-Puffer (5 mM Glucose) benötigt, dem zuvor 2 μl Fluo-3/AM-Stammlösung und 1 μl Pluronsäure-Stammlösung (s. Kap. 3.1.4) zugesetzt worden war. Pluronsäure fördert die Verteilung von Fluo-3/AM im Medium. Die

Endkonzentration des Fluo-3/AM-Inkubationsmediums betrug dann 2 μM . Die Beladungsdauer bei 37°C betrug 60 min (Quesada et al., 2000; Nadal et al., 1999).

3.3.2.5 Kalibrierung

Eine absolute Messung der Ca^{2+} -Konzentration ist aufgrund des Einflusses zahlreicher Störfaktoren auf die Fluoreszenzintensitäten nicht möglich. Diese Störfaktoren führen zu schwankenden Qantenausbeuten. Beispiele dieser Störfaktoren sind pH-Wertveränderungen, Einflüsse der Lösungsmittel, mögliche Eigenabsorptionen des Präparates bzw. der optischen Bauelemente (insbes. des Objektivs), Rauschen des Detektors oder auch „Fading“ des Fluorophors. Als Berechnungsgrundlage der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) dient die folgende Gleichung:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot Q \cdot (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R)$$

- K_d : Dissoziationskonstante des Ca^{2+} -Fura-2-Chelates ($K_d = 0,14 \mu\text{M}$)
- Q : $Q = F_{\min} / F_{\max}$
- R : $R = F_{340} / F_{380}$
- R_{\min} : minimale Fluoreszenzratio, $R_{\min} = F_{\min,340} / F_{\min,380}$ (Ca^{2+} -freie Lösung)
- R_{\max} : maximale Fluoreszenzratio, $R_{\max} = F_{\max,340} / F_{\max,380}$ (in Anwesenheit einer definierten Ca^{2+} -Konzentration)

Durch Beladung der Pankreasinsel mit dem Indikator resultiert ein diffuses Verteilungsprofil, das auf verschiedene Mechanismen zurückgeführt wird, wie zum Beispiel auf die Einschleussung des Farbstoffs in die zellulären Mikrokompartimente (Mitochondrien, ER etc.). Um diesen Umstand auszugleichen, konnte die Änderung der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration bei Verwendung der Indikatoren Fura-2/AM und Fura-PE3/AM als Indikator-Fluoreszenz-Ratio charakterisiert werden.

3.4 Mikrofluorimetrische Messung der NAD(P)H-Konzentration in B-Zellen von Pankreasinseln der Maus

Zur Bestimmung der NAD(P)H-Konzentration in Pankreasinseln konnte das 1λ -Verfahren gewählt werden, da nach Anregung der NAD(P)H-Moleküle eine Primärfluoreszenz auftritt, so dass die Markierung der entsprechenden Molekülstrukturen mit Fluoreszenzfarbstoffen nicht notwendig war. Das delokalisierte π -Elektronensystem des NAD(P)H-Moleküls hat sein Absorptionsmaximum bei 366 nm und fluoresziert bei einer Wellenlänge 470 nm. Um eine möglichst spezifische Anregung der NAD(P)H-Moleküle in den B-Zellen der Pankreasinseln zu gewährleisten und Störfluoreszenzen zu minimieren, wurde als Mikroskoplichtquelle eine Quecksilberhochdrucklampe gewählt. Diese Hg-Lampe (Hereaus-Hanau-Strahler, ST-41) hat zwei entscheidende Vorteile: 1. Sie sendet als Emissionsspektrum ein Linienspektrum aus, wobei die einzelnen Hg-Linien hohe Strahlungsintensitäten aufweisen, die bei Anregung schwacher Fluorophore notwendig werden. 2. Im Linienspektrum der Hg-Lampe existiert eine Hg-Linie im Bereich zwischen 360 nm und 370 nm, d.h. im Bereich des Absorptionsmaximums des Fluorophors. Die Voraussetzungen für eine spezifische und hinreichende Excitation der NAD(P)H-Moleküle bei 366 nm waren somit weitgehend gesichert. Kritisch zu bewerten ist hingegen, dass die hohe Strahlungsintensität ein Ausbleichen („Fading“) der Pankreasinsel begünstigt, dem entsprechend entgegengewirkt werden musste (Hellman et al., 1992).

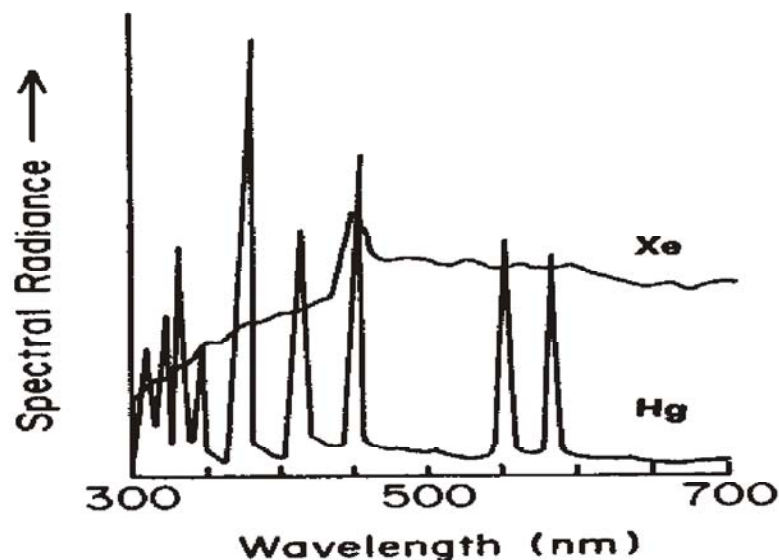


Abb. 3.6.: Vergleich unterschiedlicher Emissionsspektren der verwendeten Mikroskoplichtquellen: (Hg) Linienspektrum der Quecksilber - Hochdruckgasentladungslampe; (Xe) kontinuierliches Spektrum der Xenonlichtbogenlampe (s. website teflab. com., 2001).

Das Excitationslicht wurde über einen Lichtleiter in den Strahlengang des Epifluoreszenzmikroskops der Firma Leitz gelenkt. Da die Hg-Lampe Anregungslicht von hoher Intensität abstrahlte, wurde ein Hitze-reflektierender-Filter (Infrarotfilter) zwischen Anregungsfilter und Hg-Lampe positioniert. So konnten Schädigungen am Anregungsfilter vermieden und die Spezifizierung des Excitationslichtes optimiert werden. Mit Hilfe eines programmierbaren Schnellverschlusses (Uniblitzz-Shutter mit Kontrolleinheit VMMD-1), der als Verschluss des Lichtleiters diente, war es möglich, die Bestrahlungsdauer durch zeitgesteuerte Öffnung mit ein- bzw. zweisekündlicher Taktfrequenz auf das Objekt zu minimieren. Zur Optimierung der spezifischen Excitation der NAD(P)H-Moleküle wurde im Filterblock ein Anregungsfilter (BP 340 - 380 nm) notwendig. Mit Hilfe dieses Bandpassfilters, dessen kurzwellige Halbwertsstelle bei 340 nm und dessen langwellige Halbwertsstelle bei 380 nm angegeben waren, konnten diejenigen Wellenlängen aus dem Strahlungsangebot der Hg-Lampe herausselektiert werden, die nahe dem Absorptionsmaximum der NAD(P)H-Moleküle lagen, so dass das Ausbleichen („Fading“) der Pankreasinsel durch unspezifische Anregung reduziert werden konnte. Das so erhaltene monochromatische Licht traf dann auf einen dichromatischen Teilerspiegel („dichromatic beam-splitter“, abgekürzt CBS), der oberhalb des Objekts im Winkel von 45° im Strahlengang positioniert war. Als Teilerspiegel hat er die Eigenschaft, kurzwelliges Anregungslicht im 90°-Winkel zum Objekt hin zu reflektieren, während er für emittierte längerwellige Fluoreszenz transparent ist. Zur Bestimmung der NAD(P)H-Fluoreszenz wurde ein dichromatischer Teilerspiegel mit einer Teilerkante von 405 nm (Leitz-Block D; TK 405) gewählt. Wellenlängen unterhalb von 405 nm wurden in einem 90°-Winkel so reflektiert, dass diese, mit Hilfe des Objektivs fokussiert, auf das Objekt trafen und so der Excitation dienten. Für Wellenlängen oberhalb von 405 nm war der Teilerspiegel hingegen transparent. Deshalb konnte die angeregte Fluoreszenzstrahlung (nach Sammlung im Objektiv und Eintritt in den Filterblock) den dichromatischen Teilerspiegel passieren. Bevor das Fluoreszenzlicht den Filterblock Richtung Detektor verliess, passierte es den sog. Sperrfilter. Diese Filter reflektieren unerwünschtes Anregungslicht im Wellenlängenbereich der Emission. Durch Variation der hier als Sperrfilter verwendeten Langpassfilter wurde versucht, auftretende Störfluoreszenzen zu reduzieren.

Als Detektor diente ein Photon-Counting-Photomultiplier (Hamatsu H 3460-04). Dieser Detektor registrierte die eintreffenden Photonen und transferierte diese in ECL-Impulse. Mit einem Impulsumformer wurden diese in TFL-Pulse umgewandelt, die dann von einer handelsüblichen CTM-05 Einsteckkarte vom Computer gezählt und dargestellt werden konnten. Das Datenaufnahmeprogramm war Labtech Notebook. Vorteil des Photomultipliers

war die Möglichkeit der Detektion sehr geringer Intensitäten, da die auf seine Photodiode treffende Strahlung verstärkt wurde und erst dann in elektrische Spannung umgewandelt wurde. Demgegenüber war die fehlende räumliche Auflösung von Nachteil: Die gesamte einfallende Strahlung wurde gemeinsam verstärkt, die resultierende Spannungsschwankung war der Mittelwert der einfallenden Strahlung.

3.5 Praktische Durchführung der Fluoreszenzmessungen

In allen Arbeitsschritten, von der Präparation über die Isolierung und Kultivierung bis hin zur Beladung der Pankreasinsel wurde als Nährmedium der KR-Puffer mit einer Glucosekonzentration von 5 mM eingesetzt. Die anschließende Umströmung der Pankreasinseln erfolgte in einem geschlossenen System. Die Umströmungskammer stellte eine speziell konstruierte Kunstharzkammer dar, die in der Mitte eine Vertiefung aufwies. Diese Vertiefung wurde zunächst mit KR-Puffer (5 mM Glucose) gefüllt. Als Kleber und abdichtende Masse für das zu verwendene Deckgläschen diente Laborfett (Glisseal[®], Fa. Borer Chemie). Nach der Beladung der Langerhans'schen Insel mit dem jeweiligen Indikator (s. Kapitel 3.3.2) wurde das kreisrunde Deckgläschen, auf der in der Mitte die Pankreasinsel festgewachsen war, auf der Kunstharzkammer fest fixiert und dabei so ausgerichtet, das die festgewachsene Insel in der Vertiefung positioniert war und auf diese Weise zunächst vorsichtig umströmt werden konnte. Dabei wurde auf eine möglichst luftblasenfreie Umströmung besonderen Wert gelegt. Mit Hilfe der nachgeschalteten peristaltischen Pumpe (Varioperpex[®] 2 Pump, Fa. LKP) konnte eine gleichmässige Durchströmung des Systems gewährleistet werden (Strömungsgeschwindigkeit 200 µl/min). Nach Aufbringen eines Tropfens fluoreszenzfreiem Immersionsöl (Fa. Leitz, Wetzlar; nD=1,515) wurde die Langerhans'sche Insel im Durchlicht fokussiert. Zur exakten und endgültigen Positionierung konnte ein Schwarz-Weiß-Monitor genutzt werden.

In einigen Experimenten wurde auch versucht, die Änderung der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration an frisch isolierten Pankreasinseln zu messen. Um die Langerhans'schen Inseln zu befestigen, wurden diese auf ein mit Collagen beschichtetes Deckgläschen transferiert, auf dem vorher einseitig ein wenig Sekundenkleber aufgebracht und getrocknet worden war. Auf diese Weise blieb die Langerhans'sche Insel während der Umströmung richtig platziert.

Der wesentlichste Unterschied in der praktischen Durchführung der Perfusionen zur Bestimmung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität war, dass bei diesen Experimenten zur Durchströmung des Systems keine nachgeschaltete Pumpe eingesetzt wurde.

Die Durchströmung des Systems folgte dem Gesetz der Schwerkraft. Dazu wurden die Basis- und Testmedien in höhenverstellbare und temperierbare Schott-Gläser gestellt.

Um eine Beeinträchtigung der physiologischen Funktionsfähigkeit der Pankreasinseln zu vermeiden, war eine möglichst genaue Einhaltung der Temperatur von 37°C für die Umströmungslösungen während der Experimente entscheidend (Nadal et al., 1994). Dazu wurden die Umströmungsmedien mit Hilfe eines Wasserbads erwärmt und das Objektiv mit einer stromdurchflossenen Widerstandsfolie umwickelt und so erwärmt. Da die Kammer über das Immersionsöl mit dem Objektiv verbunden war, fand an dieser Stelle ohne Gegenmassnahmen ein Wärmeabfluss statt. Um eine möglichst geringe Abweichung von der Objekttemperatur während der Perifusion zu gewährleisten, musste das Wasserbad auf 44 - 46°C und die Widerstandsfolie am Objektiv auf 52°C temperiert werden. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen lag die gemessene Temperatur in der Umströmungskammer dann bei 35-36 °C.

Für die Fluoreszenzmessung wurde das Labor weitgehend abgedunkelt, um Messfehler durch Fremdlicht zu minimieren. Die Fluoreszenz konnte nun ohne Unterbrechung mit der eingestellten Frequenz (1 Bild/min) gemessen werden. Das Basalmedium enthielt meist 5 mM Glucose, die Stimulationsmedien enthielten die Testsubstanzen in der jeweils angegebenen Konzentration (s. auch Ergebnisteil).

Nach Beendigung der Umströmung wurde die Durchflussskammer mit bidest. Wasser gereinigt und getrocknet. Die verwendeten Schläuche wurden mit bidest. Wasser mehrmals gespült und dann getrocknet. Der Abflussschlauch der Pumpe wurde erst mit verdünntem Buraton[®] gereinigt, dann mit bidest. Wasser gespült. Gegebenenfalls wurde die Apparatur von aussen gereinigt.

3.5.1 Datenauswertung

Zur Bestimmung der Ratio [®] wurden pro Messwert 2 Bilddateien gespeichert: jeweils eine Datei für 340 nm und 380 nm Anregungswellenlänge. Für jede Datei wurden die gesamten Daten der Kurve ausgelesen. Der Vorteil in diesem System lag in der Möglichkeit, in den gespeicherten Bildern verschiedene Regionen (regions of interest, kurz ROI) auszuwählen, zu berechnen und zu vergleichen. Dazu wurde die Pankreasinsel zur Datenauswertung und Erstellung der Kinetik in 6 verschiedene Teilbereiche aufgeteilt, ein ROI wurde mittig, die anderen ROI's wurden im Uhrzeigersinn peripher positioniert (Ravier et al., 2002). Auf diese Weise konnten die Messwerte von Teilbereichen derselben Langerhans'schen Insel

verglichen werden.

Nach Ratio-Bildung wurde mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Fucal, TILL-Photonics) die Kinetik jedes einzelnen Experiments bestimmt. Mit Hilfe des Prism-Programms (GraphPad, San Diego, USA; Version 3.1) konnte so die Fluoreszenz-Ratio der einzelnen ROI's von jeweils einer Pankreasinsel graphisch dargestellt werden (s. Ergebnisse, Kapitel 4.1.1.1). Um eine quantitative Aussage machen zu können, wurde dann zunächst für jedes Experiment der Mittelwert aus den verschiedenen ROI's jeder Langerhans'schen Insel erstellt und dann wurde aus diesen Mittelwerten ($n = 4$ bis $n = 8$) ein gesamter Mittelwert erstellt. Die in den einzelnen Experimenten zu erkennenden cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen waren dann im Mittelwert nicht mehr sichtbar.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Perfusion von Pankreasinseln der Maus zum Zwecke der Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration

4.1.1 Zur Rolle der ionensensitiven Fluoreszenzfarbstoffe Fura-2, Fura-PE3 und Fluo-3 als Indikatoren in Langerhans'schen Inseln der Maus

In dem folgenden Kapitel werden die Fluoreszenzindikatoren Fura-2, Fura-PE3 und Fluo-3, die im Rahmen der in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Befunde eingesetzt wurden, unter dem Aspekt ihrer unterschiedlichen Verwendbarkeit zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in Pankreasinseln der Maus vorgestellt.

4.1.1.1 Die Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2

Die in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Befunde zur Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wurden vorwiegend mittels Beladung der Pankreasinsel der Maus mit dem etablierten Fluoreszenzindikator Fura-2 (s. Material und Methoden, Kapitel 3.3.2.1) gewonnen. Die Pankreasinsel wurde 45 Minuten bei 37°C mit Fura-2/AM beladen. Das den Indikator enthaltende Krebs-Ringer-Medium enthielt dabei 5 mM Glucose.

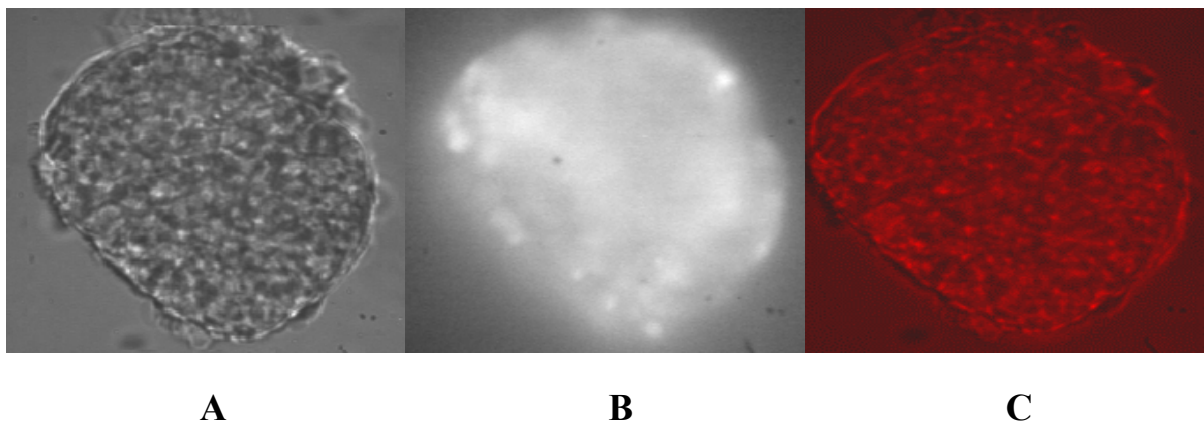


Abb. 4.1.: Darstellung einer Pankreasinsel der Maus, die mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2 beladen ist. (A) Darstellung im Durchlicht, (B) Darstellung der Fluoreszenzemission ($> 510 \text{ nm}$), angeregt bei 340 nm und 380 nm, (C) Darstellung der homogen verteilten Fluoreszenz nach Ratio-Bildung, wobei die Ratio auf das Durchlichtbild projiziert worden ist.

Ergebnisse

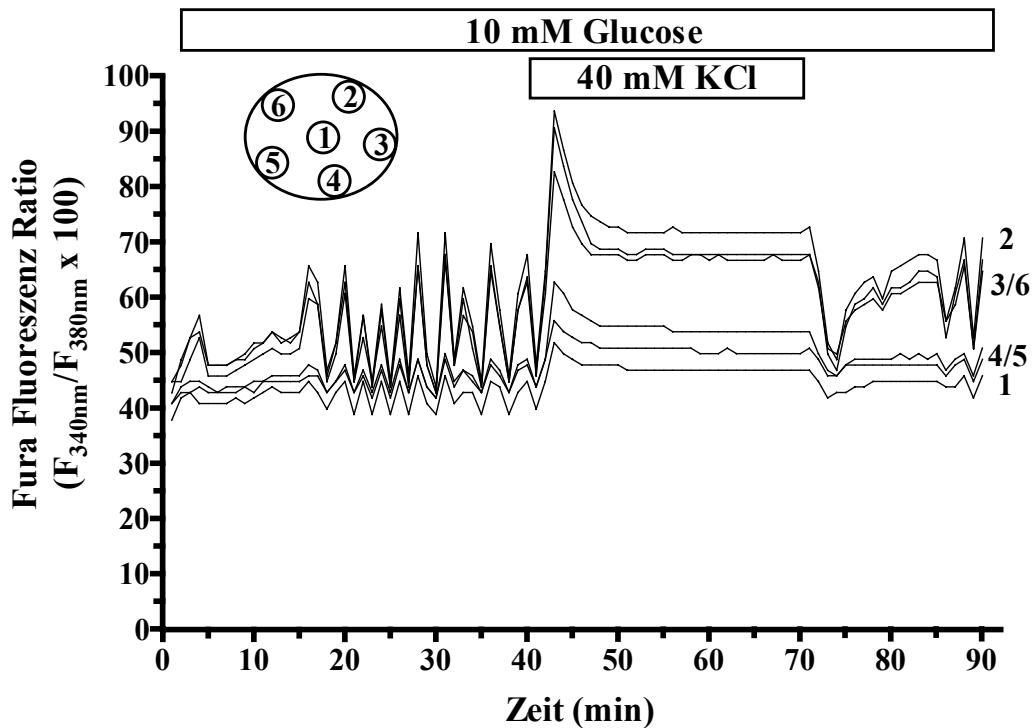


Abb. 4.2.: Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol in Gegenwart einer hohen Kaliumkonzentration. Eine kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit einer Krebs-Ringer-Lösung, die 10 mM Glucose enthielt, von der Minute 0 bis Minute 90 umströmt. Die Depolarisation mit 44,7 mM Kaliumchlorid erfolgte von der Minute 40 bis Minute 70. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für 2 weitere Umströmungen. Dargestellt ist die Fura-Fluoreszenz-Ratio von 6 ausgewählten regions of interest (ROI's) der Pankreasinsel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten (nähere Erläuterung im Text).

Nach erfolgreicher Beladung mit dem Indikator Fura-2 wurde die kultivierte Pankreasinsel, wie in der Abbildung 4.2. dargestellt, umströmt. Nach Aufnahme der Fluoreszenzintensitäten (s. Material und Methoden, Kapitel 3.3.1 und 3.5) und Beendigung der Perifusion wurden 6 Teilbereiche des Pankreasinsel als sog. regions of interest, abgekürzt ROI (Valdeolmillos et al., 1993; Gilon et al., 1994), zur Ermittlung der Ratio-Werte (experimentelle Werte von $[\text{Ca}^{2+}]_i$) definiert und mit Hilfe des Fucal-Programms (Fucal, Till-Phototonics) ausgewertet (s. Material und Methoden, Kapitel 3.5.1). Das jeweilige Kurvenprofil der Kinetik wurde dann den jeweiligen ROI's der Pankreasinsel zugeordnet (Abb. 4.2.).

Zu Beginn der Umströmung konnte innerhalb weniger Minuten ein Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio registriert werden. Der mittig positionierte Teilbereich (ROI 1) wies dabei üblicherweise die geringsten Ratio-Werte auf. Nach einer Latenzzeit von 15 Minuten wurden synchrone, regelmässige und niederfrequente ($x_{(n=3)} = 0,3/\text{min}$) cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen sichtbar. Die Minima der Amplituden dieser Oszillationen lagen mit Ausnahme von ROI 1 bei Ratio-Werten um 42. Dahingegen waren die Maxima der Amplituden über die

Pankreasinsel verteilt unterschiedlich stark ausgeprägt. Dabei erreichte der Spitzenwert einen Ratio-Wert von 72 (ROI 2). Die Einwirkung der depolarisierend wirkenden K^+ -Konzentration (44,7 mM) verursachte mit schneller Kinetik einen ausgeprägten Ca^{2+} -Peak, der Spitzenwert lag bei einem Ratio-Wert um 93 (ROI 2). Ohne Verzögerung schloss sich eine absteigende Tendenz an und dann entwickelte sich eine Plateauphase mit maximalen Ratio-Werten von 72 (ROI 2). Nach Absenkung der K^+ -Konzentration auf Ausgangswerte (4,7 mM) konnte eine abrupte Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ auf einen Ratio-Wert um 46 (ROI 2) registriert werden. Im Anschluss daran resultierte ein Wiederanstieg der $[Ca^{2+}]_i$ und es konnten erneut Ca^{2+} -Oszillationen induziert werden. Eine solche Umströmung mit einer hohen K^+ -Konzentration wurde routinemäßig durchgeführt zur Prüfung der elektrischen Aktivierbarkeit und der funktionellen Integrität der B-Zellen, die im Zellverband der intakten Langerhans'schen Insel der Maus vorlagen.

In der folgenden Abbildung 4.3. ist der direkte Vergleich des Effektes einer K^+ -Depolarisation mit demjenigen verursacht durch Cyclopiazonicsäure (abgekürzt CPA) dargestellt.

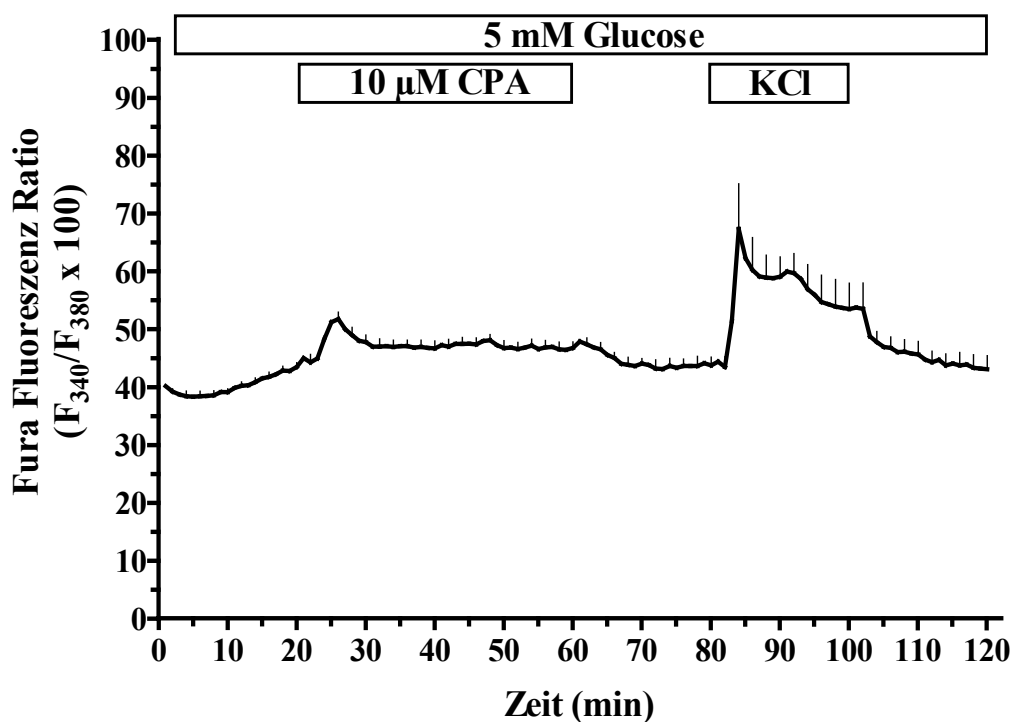


Abb. 4.3.: Direkter Vergleich der Wirkung einer hohen K^+ -Konzentration mit dem Effekt von Cyclopiazonicsäure auf die Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol. Eine kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit einer Krebs-Ringer-Lösung, die 5 mM Glucose enthielt, von der Minute 0 bis Minute 120 umströmt. In der Minute 20 wurde diesem Medium 10 μ M Cyclopiazonicsäure (CPA) für 40 Minuten zugesetzt. Nach einer Erholungsphase von 20 Minuten (Minute 60 bis 80) erfolgte die Depolarisation mit 44,7 mM Kaliumchlorid (Minute 80 bis 100). Abgebildet ist ein Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten. Dargestellt ist die Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Die umströmten Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen verwendet.

Ergebnisse

CPA ist eine Substanz, die die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher der B-Zelle hemmt und somit zu einer Erhöhung der Konzentration von Ca^{2+} -Ionen im Cytosol der B-Zellen beiträgt. Wie im Mittelwert dargestellt (Abb. 4.3.) konnten zu Beginn der Umströmung in Gegenwart von 5 mM Glucose Ratio-Werte um 40 beobachtet werden, die sich dann auf Ratio-Werte um 43 erhöhten. Durch 10 μM CPA entwickelte sich nach einer Latenz von ca. drei Minuten ein Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio auf 52, dem eine Plateauphase folgte mit Ratio-Werten um 47. In der Erholungsphase sanken die Ratio-Werte auf 44 ab. Durch die hohe K^+ -Konzentration hingegen konnte ein Ca^{2+} -Peak induziert werden, wobei Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte bis 67 erreicht wurden. Im Anschluss daran entwickelte sich eine Plateauphase mit Ratio-Werten um 60 aus, die dann leicht absank. In der Auswaschphase konnte dann eine schnelle Absenkung der Ratio-Werte fast bis auf den Ausgangswert beobachtet werden.

Die Perifusion einer Pankreasinsel der Maus mit stimulatorischer (10 mM) und substimulatorischer (5 mM) Glucosekonzentration ergab folgendes Ergebnis (Abb. 4.4.):

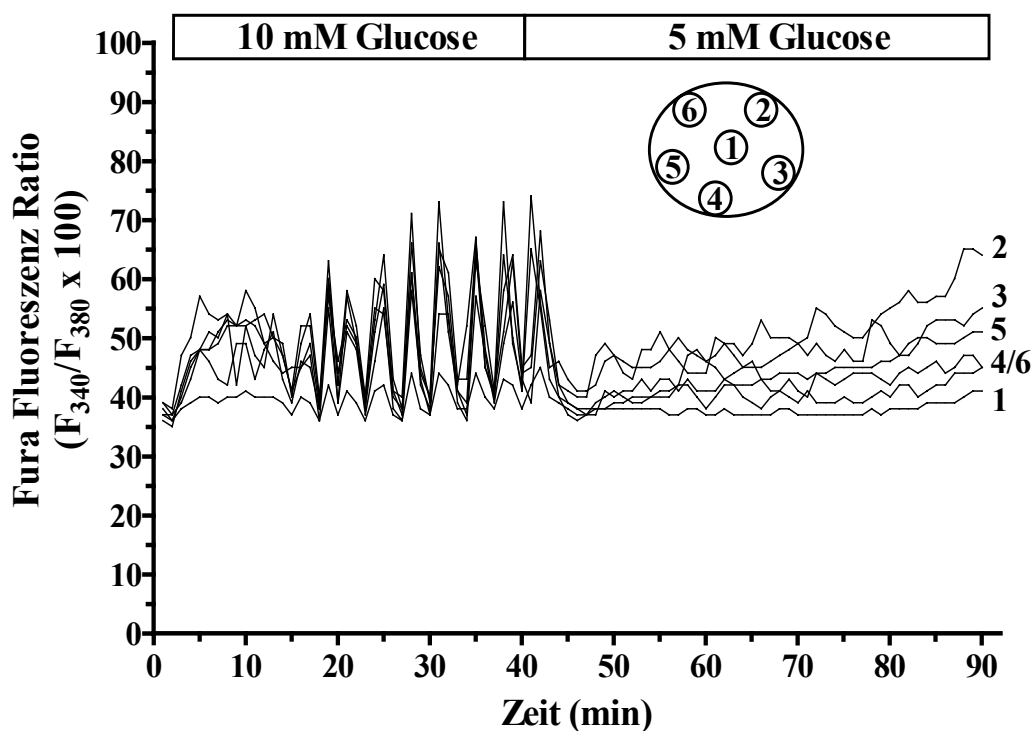


Abb. 4.4.: Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol in Anwesenheit von Glucose. Eine kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde von Minute 0 bis 40 mit einer Krebs-Ringer-Lösung, die 10 mM Glucose enthielt, umströmt. Dann folgte eine Expositionsphase von 50 Minuten, in der die Insel mit einer Krebs-Ringer-Lösung, die nur 5 mM Glucose enthielt, perfundiert wurde. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für 5 weitere Umströmungen. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio der 6 ausgewählten ROI's der Pankreasinsel ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

Ergebnisse

Nach einer Latenz von 15 Minuten entwickelten sich in Gegenwart von 10 mM Glucose synchrone, regelmässige und niederfrequente ($x_{(n=6)} = 0,3/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen. Die Minima der Amplituden der Oszillationen aller Teilbereiche einschliesslich ROI 1 unterschieden sich nicht, der Ratio-Wert lag bei 36. Die Maxima der Amplituden der einzelnen ROI's lagen - mit Ausnahme von ROI 1 - ebenfalls nahe beieinander, der Spitzenwert lag bei 72. Nach Erniedrigung der Glucosekonzentration auf 5 mM sanken die Ratio-Werte nach vier Minuten bis auf Ausgangswerte zurück (Ratio 40). Es konnten dann keine Ca^{2+} -Oszillationen mehr registriert werden, wohl aber eine zunehmende Divergenz der einzelnen ROI's untereinander.

Die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einzelner kultivierter B-Zellen konnte im Kurvenverlauf des folgenden Mittelwertes dokumentiert werden (Abb. 4.5.):

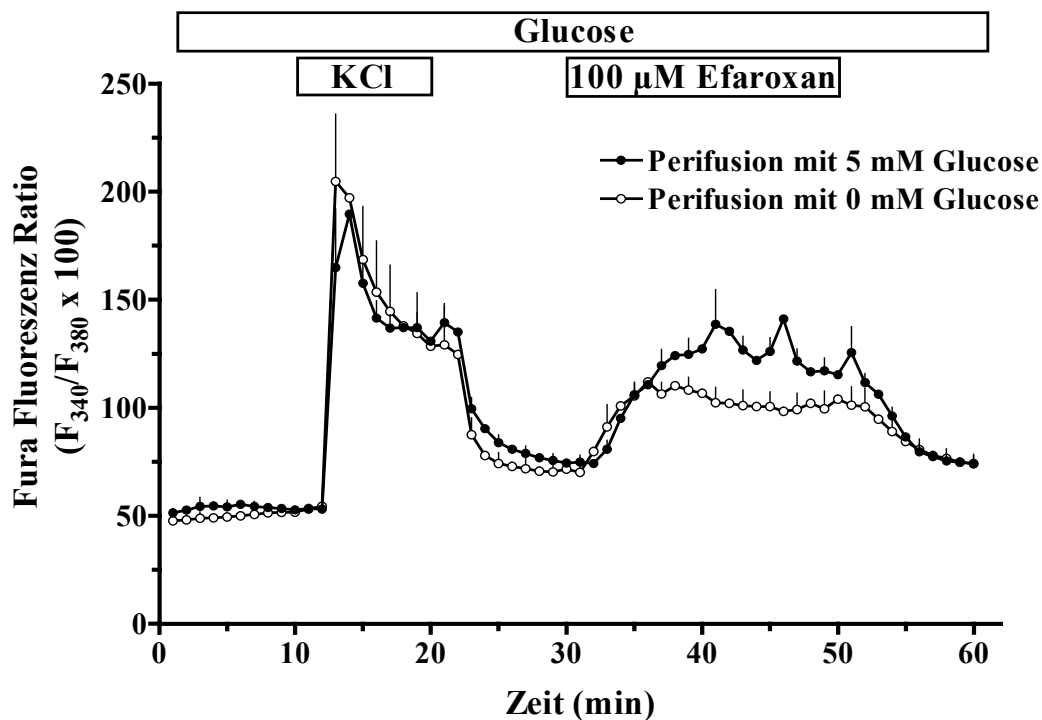


Abb. 4.5.: Der Efaroxan-induzierte Effekt auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in kultivierten B-Zellen in Gegenwart von Glucose. Die mit Fura-2 beladenen B-Zellen wurden mit Krebs-Ringer-Medium, das 0 mM Glucose bzw. 5 mM Glucose enthielt, umströmt. Von Minute 10 bis 20 wurden die B-Zellen mit 44,7 mM Kaliumchlorid umströmt, um sie dann mit 100 μM Efaroxan zu perifundieren (Minute 30-50). Beide Kurvenverläufe stellen Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 3 Perifusionen dar, wobei jeweils 9 B-Zellen untersucht wurden. Dargestellt ist die Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

Der Ausgangswert der beiden dargestellten Mittelwerte (Ratio 50) lag um 10-20 Einheiten höher als der Ausgangswert, der üblicherweise in Kurvenverläufen zu beobachten war, da in diesem Fall andere Belichtungszeiten verwendet wurden. Durch 44,7 mM Kaliumchlorid entwickelte sich in Gegenwart von 5 mM Glucose mit schneller Kinetik ein Ca^{2+} -Peak

(Ratio 185). Nach Absenkung der K^+ -Konzentration auf 4,7 mM konnten durchschnittliche Ratio-Werte um 75 registriert werden. Durch 100 μ M Efaroxan stieg die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration dann vor allem in Gegenwart von 5 mM Glucose innerhalb von 8 Minuten bis zur Ausbildung eines Plateaus von durchschnittlichen Ratio-Werten um 125 kontinuierlich an. In der folgenden Auswaschphase sank dann die Fura-Fluoreszenz-Ratio innerhalb von 10 Minuten erneut auf durchschnittliche Ratio-Werte um 75 ab.

Es wurden in Einzelfällen auch Perfusionen an frisch isolierten Pankreasinseln der Maus durchgeführt. Die Langerhans'sche Insel wurde direkt nach der Isolierung 60 Minuten mit dem Fluoreszenzindikator Fura-2/AM bei Raumtemperatur beladen. Dann wurde diese Pankreasinsel, wie im Kapitel 3.1.8.2 (s. Material und Methoden) beschrieben, auf dem Deckglas positioniert und umströmt.

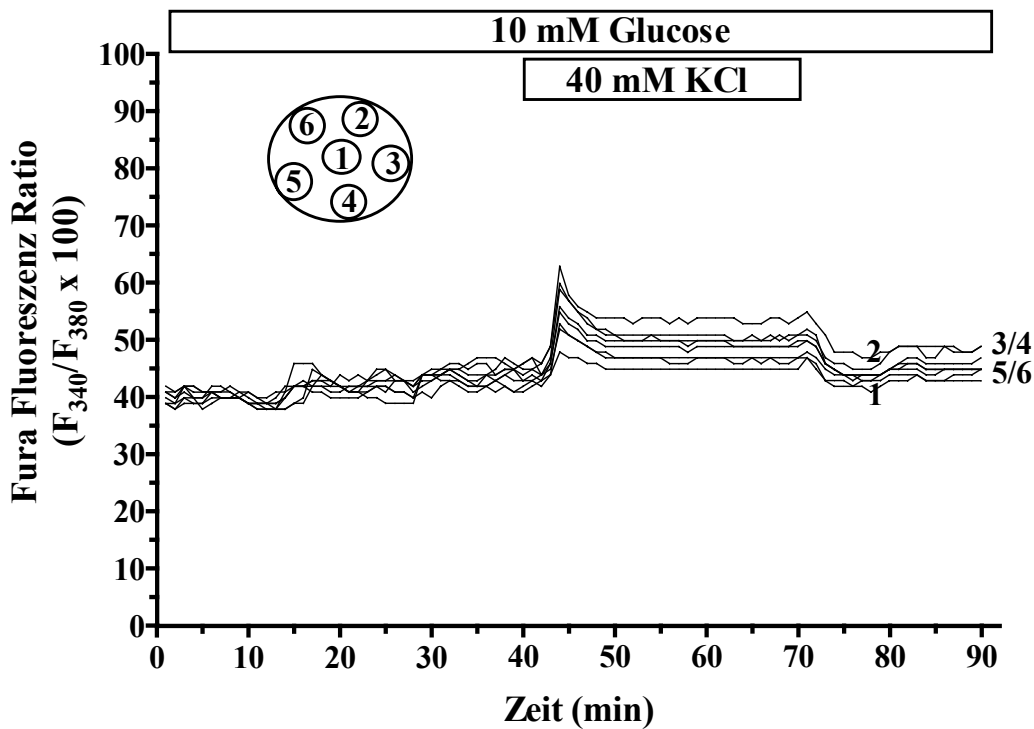


Abb. 4.6.: Bestimmung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol einer frisch isolierten Pankreasinsel der Maus in Gegenwart einer hohen K^+ -Konzentration bei Raumtemperatur. Die mit Fura-2 beladene Insel wurde mit einer Krebs-Ringer-Lösung, die 10 mM Glucose enthielt, von der Minute 0 bis Minute 90 umströmt. Die Depolarisation mit 44,7 mM Kaliumchlorid erfolgte von der Minute 40 bis Minute 70. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für 2 weitere Umströmungen. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio der 6 ausgewählten ROI's der Insel ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

Es entwickelten sich während der Umströmung bei Raumtemperatur in der frisch isolierten Pankreasinsel in Gegenwart von 10 mM Glucose keine cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen. Nach Depolarisation mit einer hohen K^+ -Konzentration (44,7 mM) stieg die $[Ca^{2+}]_i$ mit schneller Kinetik von Ratio-Werten um 46 (ROI 2) auf maximale Ratio-Werte um 64 (ROI 2)

an. Es entwickelte sich dann eine Plateauphase mit Ratio-Werten von 53 (ROI 2). Nach Beendigung der Exposition mit der hohen K^+ -Konzentration sank die $[Ca^{2+}]_i$ annähernd wieder auf den Ausgangswert zurück (ROI 2: Ratio 47).

Frisch isolierte Pankreasinseln der Maus wurden auch bei 37°C mit einem KR-Puffer umströmt, der 100 μM Efaroxan und zwei verschiedene Glucosekonzentrationen enthielt:

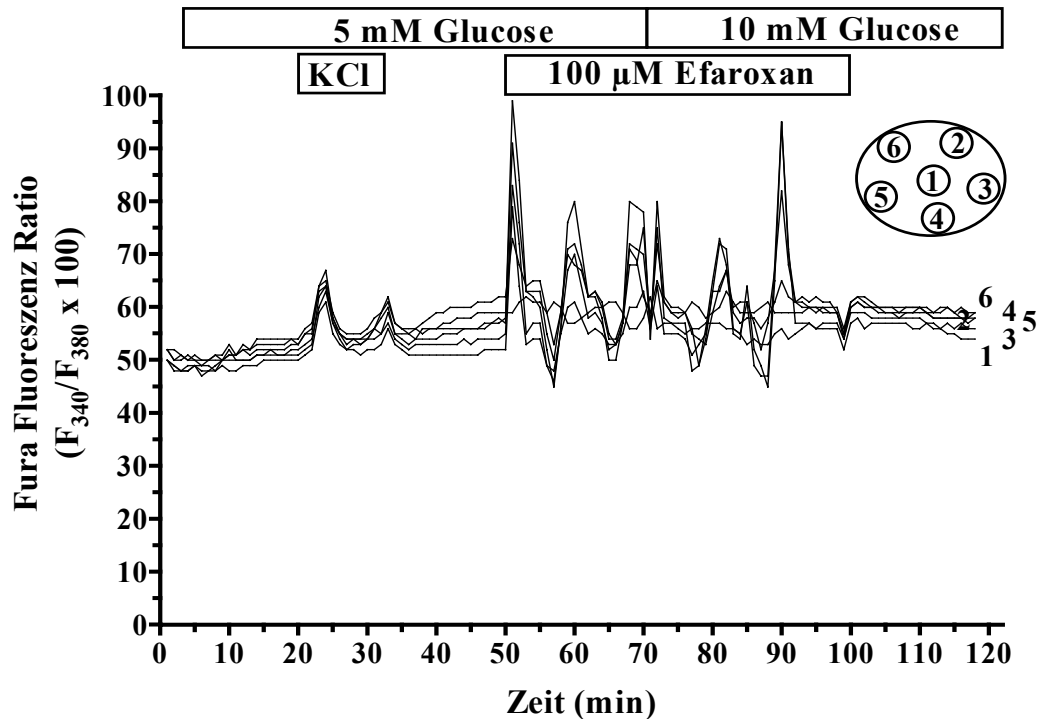


Abb. 4.7.: Der Efaroxan-induzierte Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ in einer frisch isolierten Pankreasinsel der Maus in Gegenwart von Glucose bei 37°C. Die mit Fura-2 beladene Insel wurde zunächst mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Zur Prüfung ihrer funktionellen Integrität wurde die Insel 10 Minuten mit 44,7 mM Kaliumchlorid versetzt (Minute 20 bis 30). Dann wurde mit 100 μM Efaroxan perfundiert (Minute 50 bis 100), wobei ab Minute 70 eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM erfolgte. Abgebildet ist ein Einzelexperiment. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

Die Ratio-Werte der einzelnen regions of interest lagen zu Beginn der Perifusion mit 5 mM Glucose durchschnittlich bei 50. Der durch die K^+ -Depolarisation erfolgende maximale Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration war gering (ROI 6: Ratio 65). Nach Absenkung der K^+ -Konzentration (4,7 mM) wurden Ratio-Werte um 56 (ROI 6) erreicht. Durch 100 μM Efaroxan konnten - analog zu den Befunden desselben experimentellen Protokolls, die in kultivierten Pankreasinseln beobachtet wurden (Abb. 4.21.) - in Gegenwart beider Glucosekonzentrationen zum Teil synchrone und regelmässige cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet werden. Diese Ca^{2+} -Oszillationen waren niederfrequent ($x_{(n=1)}=0,15/\text{min}$ in

Ergebnisse

Gegenwart von 5 mM Glucose; $x_{(n=1)}=0,16/\text{min}$ in Gegenwart von 10 mM Glucose). Maxima und Minima der Amplituden der Oszillationen der einzelnen ROI's waren unterschiedlich, die Minima lagen zum Teil unter dem Niveau des Ausgangswertes. In der Auswaschphase konnte kein oszillatorisches Muster mehr registriert werden. Da sich die frisch isolierten Pankreasinseln sehr häufig während der Perifusion vom Deckglas ablösten (s. Kapitel 3.5), war die quantitative Ausbeute dieser Experimente gering.

Zur Prüfung, ob die Ca^{2+} -Messungen durch Autofluoreszenzen der Testsubstanzen verfälscht werden können, wurden unbeladenen Pankreasinseln der Maus mit Efaroxan und RX871024 perfundiert (Abb. 4.8., Abb. 4.9. und Abb. 4.10.).

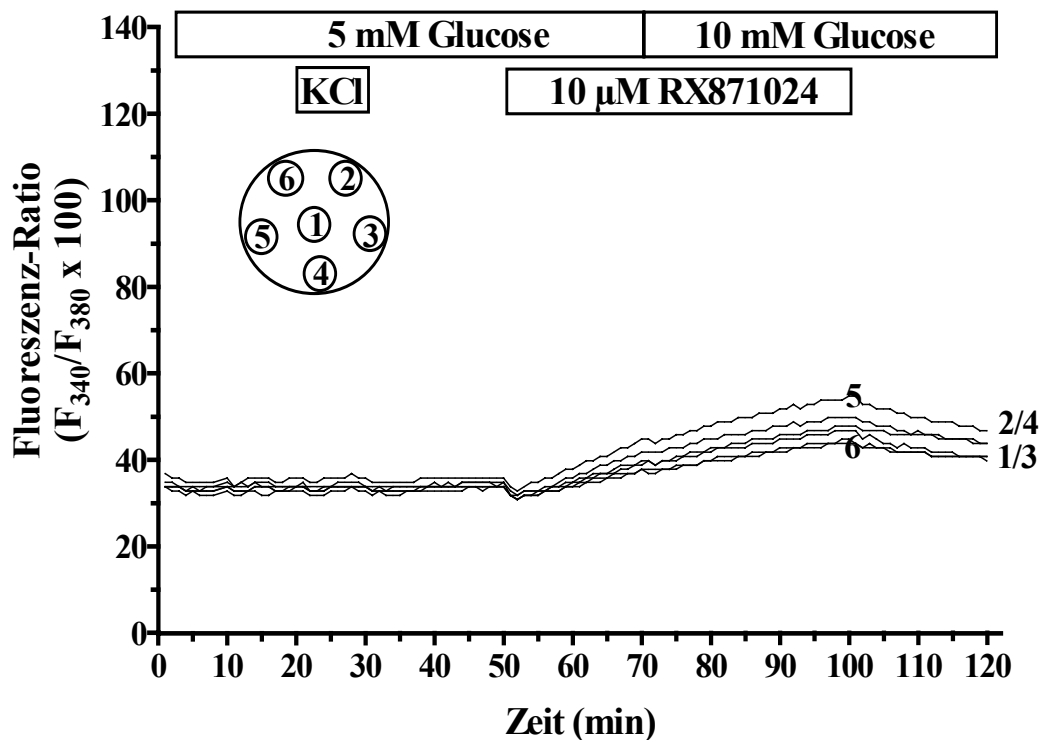


Abb. 4.8.: Konzentrationsabhängige Autofluoreszenz des Imidazolins RX871024. Die kultivierte und unbeladene Pankreasinsel der Maus wurde zunächst mit Krebs-Ringer-Lösung, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). In der Minute 20 wurde dem Medium für 10 Minuten 40 mM K^+ zugesetzt. Ab Minute 50 wurde die Exposition mit 10 μM RX871024 eingeleitet (Minute 50 bis 100), wobei ab Minute 70 eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM erfolgte. Abgebildet ist ein Einzelexperiment. Die Autofluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

Zu Beginn der Perifusion konnte keine Änderung in der Fluoreszenz registriert werden, der Ausgangswert der Ratio-Werte der einzelnen Teilbereiche lag ca. bei 35 (Abb. 4.8.). Bei Exposition mit 10 μM RX871024 konnte eine leichte kontinuierliche Zunahme der Ratio-Werte - unerwarteterweise ohne Ausbildung eines steady states - dokumentiert werden. Nach Beendigung dieser Exposition sanken die Ratio-Werte wieder leicht ab.

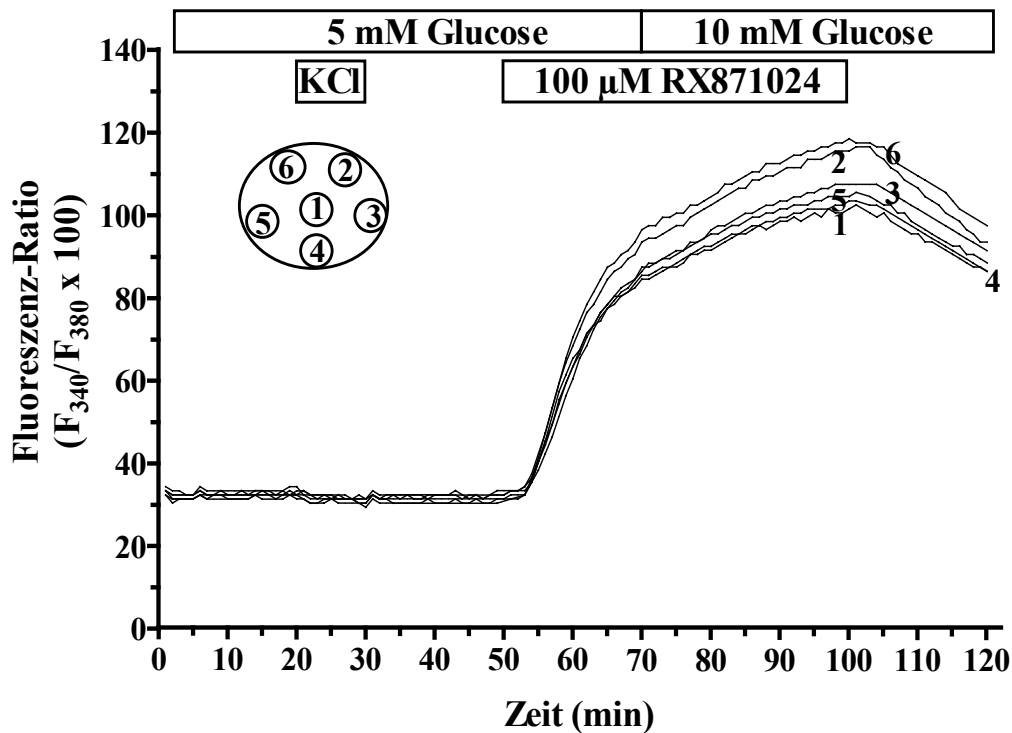


Abb. 4.9.: Konzentrationsabhängige Autofluoreszenz des Imidazolins RX871024. Die kultivierte, unbeladene Pankreasinsel der Maus wurde zunächst mit Krebs-Ringer-Lösung, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). In der Minute 20 wurde dem Medium für 10 Minuten 40 mM K⁺ zugesetzt. Ab Minute 50 wurde die Exposition mit 100 µM RX871024 eingeleitet (Minute 50-100), wobei ab Minute 70 eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM erfolgte. Abgebildet ist ein Einzelexperiment. Die Autofluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

Mit 100 µM RX871024 war folgendes Ergebnis zu beobachten (Abb. 4.9.): Während der K⁺-Depolarisation konnte keine Änderung in der Fluoreszenz registriert, der Ausgangswert der Ratio-Werte der einzelnen ROI's lag bei 32. Der steile Anstieg der Ratio-Werte bedingt durch 100 µM RX871024 dauerte ca. 8-10 Minuten (ROI 6: Ratio 70), dann konnte eine kontinuierliche, weniger steile Zunahme beobachtet werden, der maximale Ratio-Wert vor Beendigung der Exposition mit 100 µM RX871024 lag bei 117 (ROI 6). Auch hier konnte kein steady state beobachtet werden. Während der Auswaschphase konnte nur ein partieller Rückgang der Ratio-Werte beobachtet werden, was die Akkumulation in den B-Zellen belegt.

Mit dem gleichen experimentellen Protokoll wurde untersucht, ob die Testsubstanz Efaroxan eine Autofluoreszenz aufweist (Abb. 4.10.). Während der gesamten Umströmung konnten durchgehend Autofluoreszenz-Ratio-Werte zwischen 32 und 36 registriert werden, eine Erhöhung der Ratio-Werte durch 100 µM Efaroxan blieb aus.

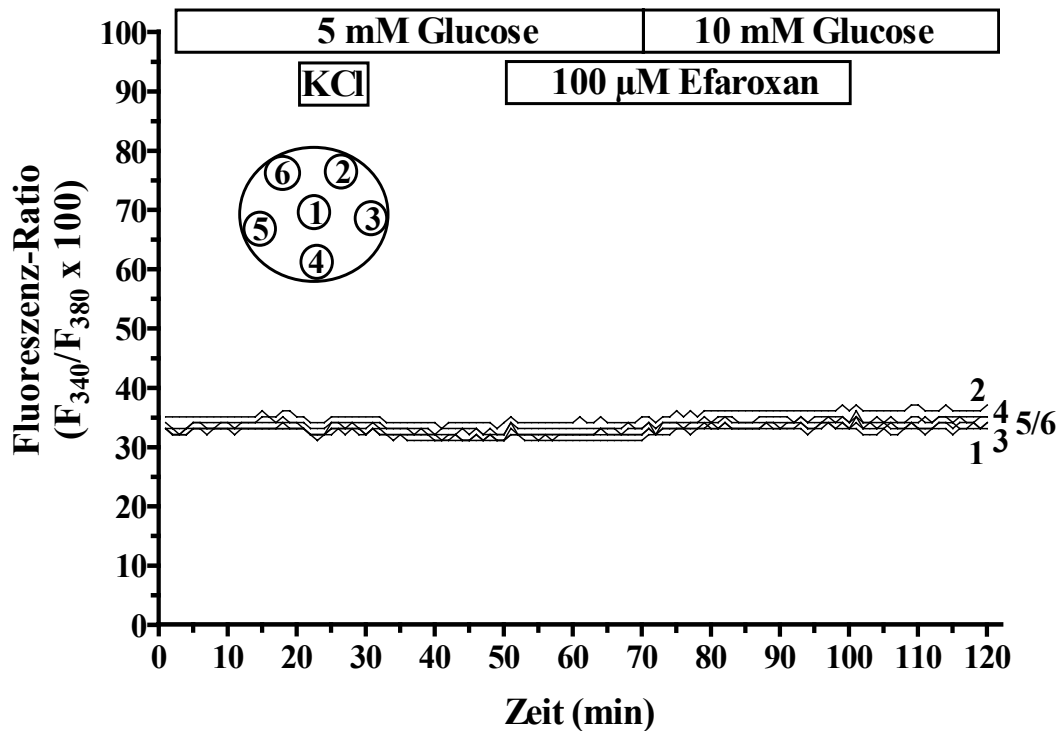


Abb. 4.10.: Fehlende Autofluoreszenz des Imidazolins Efaroxan. Die kultivierte, unbeladene Pankreasinsel der Maus wurde zunächst mit Krebs-Ringer-Lösung, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). In der Minute 20 wurde diesem Medium für 10 Minuten 40 mM Kaliumchlorid zugesetzt. Ab Minute 50 wurde dann die Exposition mit 100 μ M Efaroxan eingeleitet (Minute 50 bis 100), wobei ab Minute 70 eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM erfolgte. Abgebildet ist ein Einzelexperiment. Die Autofluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass Messungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch 100 μ M RX 871024 verfälscht werden können, nicht aber durch das Imidazolin Efaroxan. Eine Korrektur der Messungen des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals in Gegenwart von 100 μ M RX871024 ist deshalb dringend erforderlich (s. Kapitel 4.2.2.5).

4.1.1.2 Die Bestimmung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-PE3

Gelegentlich zeigten sich bei Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus nach Beladung mit Fura-2 Unregelmässigkeiten im Kurvenverlauf dergestalt, dass die Fura-Fluoreszenz-Ratio im Verlauf der Umströmung kontinuierlich anstieg. Der in der Abbildung 4.11. dargestellte im Verlauf der Perifusion kontinuierliche Anstieg in der Fura-Fluoreszenz-Ratio konnte durch Verwendung des höhermolekularen Derivats Fura-PE3 zur Beladung der Pankreasinseln stark vermindert werden (Abb. 4.12.).

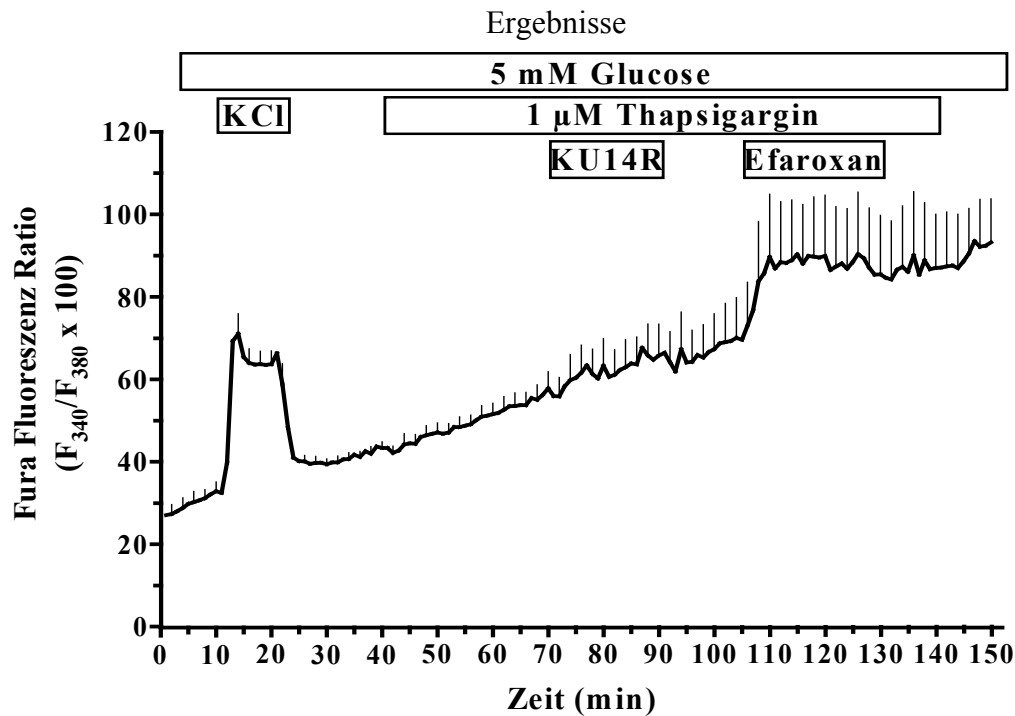


Abb. 4.11.: Perfusion der kultivierten Pankreasinsel der Maus nach Beladung mit Fura-2. Die Insel wurde während der gesamten Expositionsphase mit KR-Medium und 5 mM Glucose umströmt. Nach Depolarisation mit 44,7 mM K^+ für 10 Minuten wurde mit 1 μ M Thapsigargin perfundiert (Minute 40 bis 140). Die Testsubstanzen KU14R (300 μ M) und Efaroxan (100 μ M) wurden in der Minute 70-90 bzw. 105-130 zugesetzt. Abgebildet ist ein Mittelwert \pm SEM ($n=5$), die Pankreasinseln wurden aus 2 Präparationen gewonnen. Dargestellt ist die Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

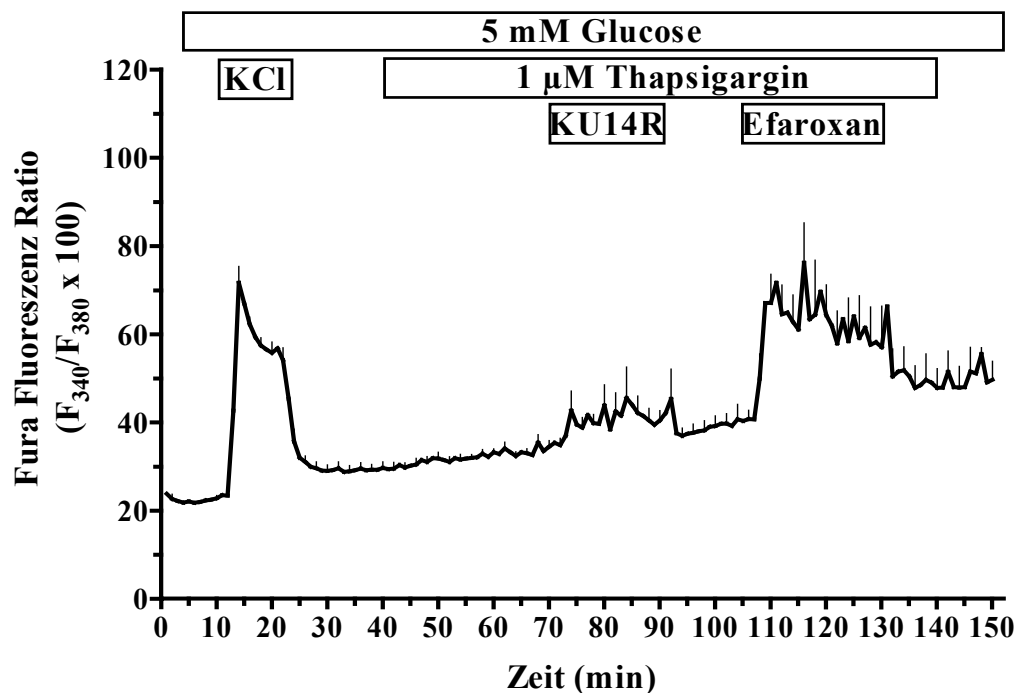


Abb. 4.12.: Perfusion der kultivierten Pankreasinsel der Maus nach Beladung mit Fura-PE3. Die Insel wurde die ganze Zeit mit KR-Medium und 5 mM Glucose umströmt. Nach Depolarisation mit 44,7 mM K^+ für 10 Minuten wurde mit 1 μ M Thapsigargin perfundiert (Minute 40-140). Die Testsubstanzen KU14R (300 μ M) und Efaroxan (100 μ M) wurden in der Minute 70-90 bzw. 105-130 zugesetzt. Abgebildet ist ein Mittelwert \pm SEM ($n=4$). Die Pankreasinseln wurden aus 2 Präparationen gewonnen. Dargestellt ist die Fura-Fluoreszenz-Ratio in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

Daraus kann abgeleitet werden, dass die kontinuierliche Ratio-Erhöhung während der Umströmung nach Beladung mit Fura-2 sehr wahrscheinlich durch das schon des öfteren beschriebene „leakage“, d.h. durch das „Auslaufen“ von Fura-2 aus dem Interzellularraum der Pankreasinsel, verursacht wurde (s. Material und Methoden, Kapitel 3.3.2.2).

4.1.1.3 Zur Rolle von Fluo-3 als ionensensitiver Fluoreszenzindikator eingesetzt im 1 λ -Verfahren

Die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in kultivierten Pankreasinseln der Maus wurde auch mit Hilfe des 1 λ -Verfahrens bestimmt (s. Material und Methoden, Kapitel 3.3.1 und 3.3.2.3), mit dem Ziel, zwei Fluoreszenzparameter (die Fluoreszenz des Ca^{2+} -Indikator-Komplexes und die NAD(P)H-Fluoreszenz) in der Pankreasinsel während einer Perifusion gleichzeitig zu messen. Mit Fluo-3 war es nur mit einer hohen Anzahl von Experimenten möglich, aussagefähige Mittelwerte zu erhalten. Obwohl prinzipiell das gleiche Phänomen wie mit Fura-2 darstellbar war - in Abbildung 4.13. ist eine Perifusion durchgeführt am 2 λ -Epifluoreszenzmikroskop zu beobachten -, wurde das Messverfahren mit Fluo-3 nicht weiter verfolgt.

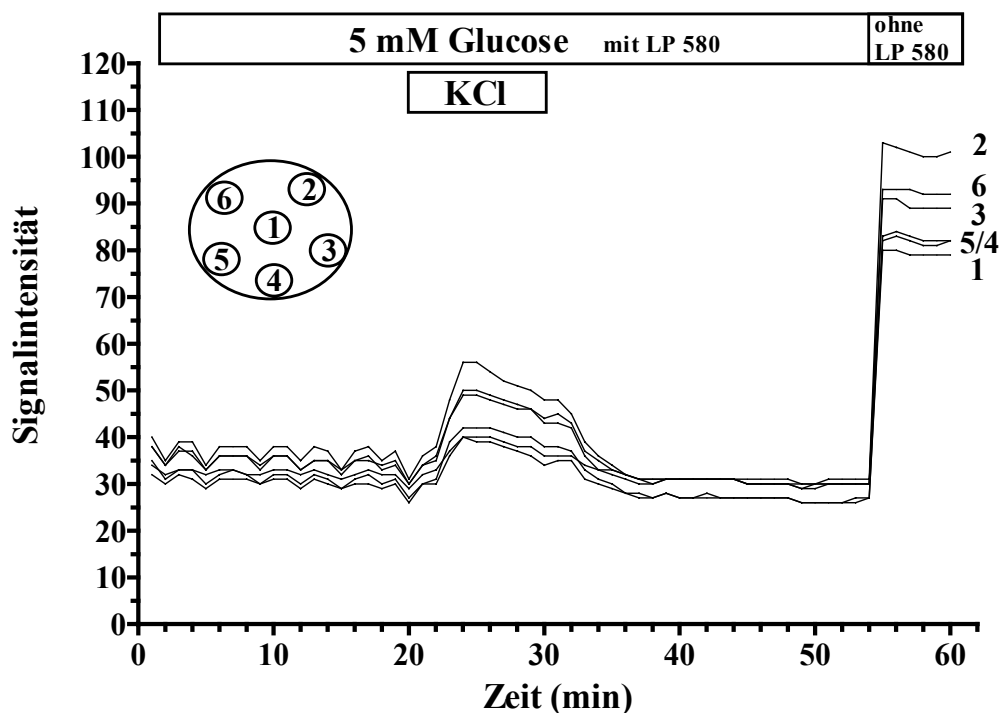


Abb. 4.13.: Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Beladung mit Fluo-3. Die Pankreasinsel der Maus wurde während der gesamten Expositionsphase mit 5 mM Glucose umströmt, von Minute 0 bis 53 wurde ein Langpassfilter für 580 nm eingesetzt, ab Minute 54 wurde dieser Langpassfilter (LP) entfernt. In der Minute 20 wurden für 10 Minuten 40 mM Kaliumchlorid zugesetzt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, durchgeführt am 2 λ - Epifluoreszenzmikroskop. Die Signalintensität ist dargestellt in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten.

4.2 Mechanismus der Imidazolin-induzierten Insulinsekretion

4.2.1 Antagonismus der insulintropen Wirkung der Imidazoline Alinidin, Idazoxan, Phentolamin und Efaroxan durch Diazoxid

Untersucht wurde, ob der K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid in der Lage ist, die insulinsekretionssteigernden Effekte der Imidazoline Alinidin, Idazoxan, Phentolamin und Efaroxan auf die Insulinsekretion in frisch isolierten Pankreasinseln der Maus aufzuhalten. Als Vergleichssubstanzen für die Imidazoline wurden Tolbutamid und Chinin eingesetzt. In allen Experimenten wurden die Langerhans'schen Inseln der Maus während der gesamten Umströmungszeit mit 10 mM Glucose perfundiert, so dass die sekretionssteigernde Wirkung aller Testsubstanzen gesichert werden konnte.

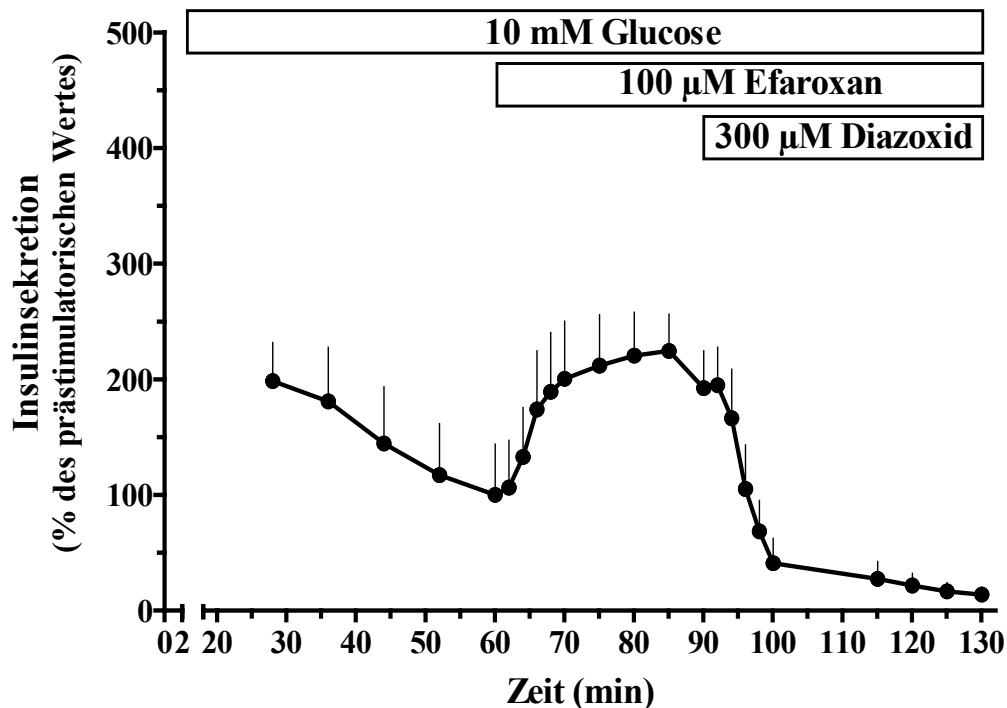


Abb. 4.14.: Antagonisierender Effekt von Diazoxid auf die Efaroxan-induzierte Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die Inseln wurden von Minute 0-130 mit einer KR-Lösung (10 mM Glucose) umströmt. Ab Minute 60 wurde diesem Medium 100 µM Efaroxan zugesetzt, ab Minute 90 zusätzlich 300 µM Diazoxid. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Abhängigkeit von der Perfusionszeit (min). Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 60) wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM (n=3).

Wie in der Abbildung 4.14. graphisch dargestellt konnte der durch 100 µM Efaroxan in Gegenwart von 10 mM Glucose induzierte prozentuale Sekretionsanstieg um 120 % durch 300 µM Diazoxid innerhalb von 10 Minuten vollständig antagonisiert werden.

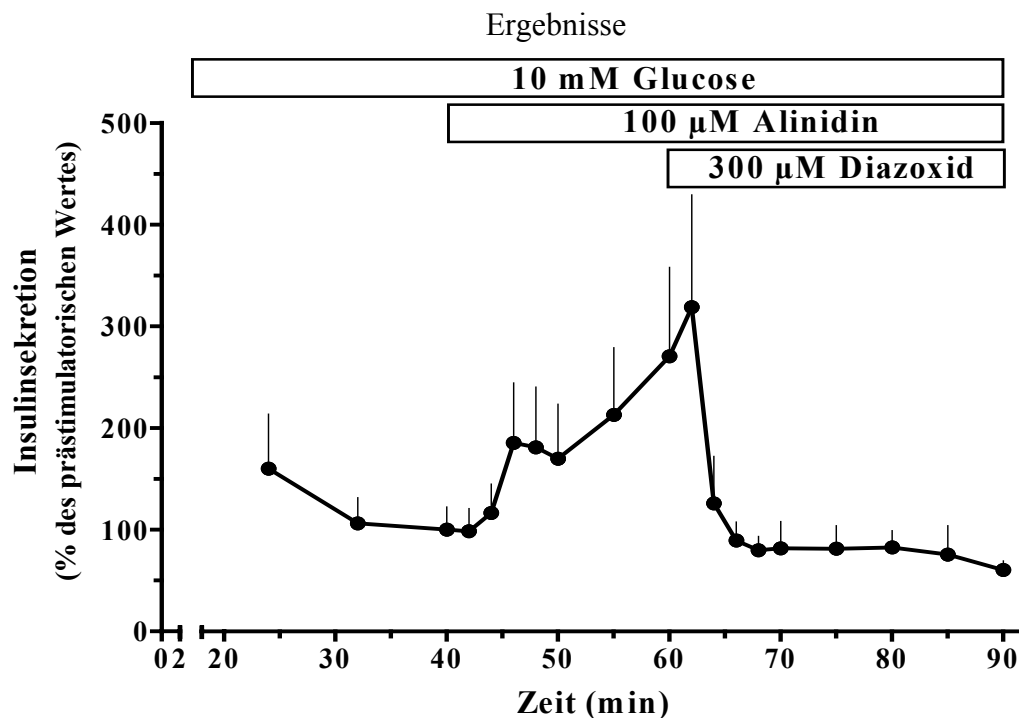


Abb. 4.15.: Antagonisierender Effekt von Diazoxid auf die Alinidin-induzierte Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus. Die Inseln wurden von Minute 0 bis 90 mit einer Krebs-Ringer-Lösung umströmt, die 10 mM Glucose enthielt. Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 μ M Alinidin zugesetzt, ab Minute 60 zusätzlich 300 μ M Diazoxid. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 40) wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten.

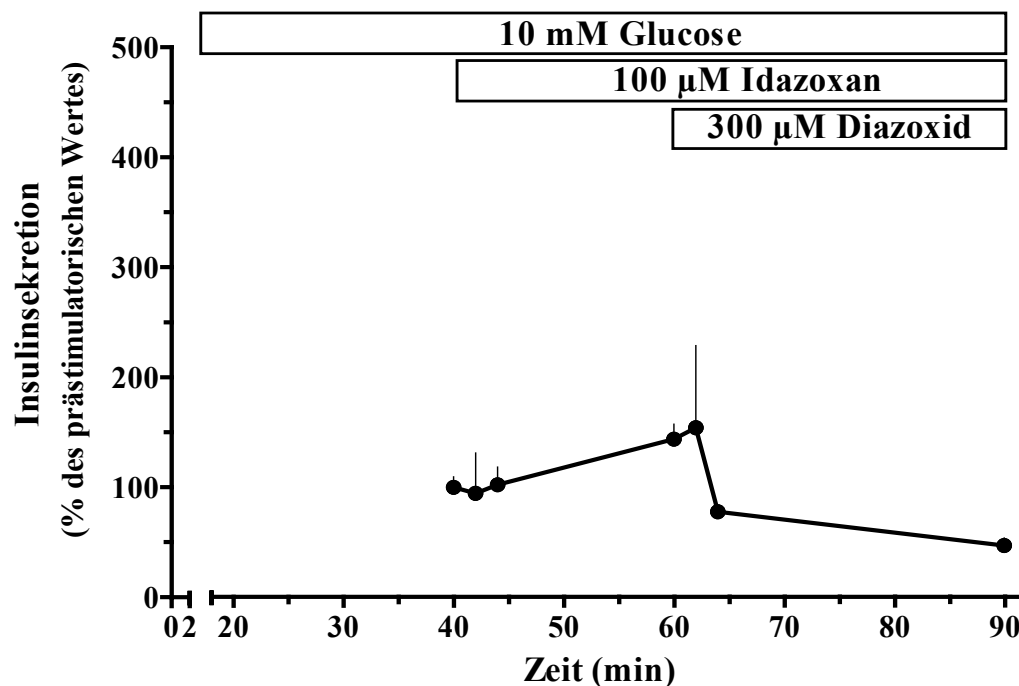


Abb. 4.16.: Antagonisierender Effekt von Diazoxid auf die Idazoxan-induzierte Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus. Die Inseln wurden von Minute 0 bis 90 mit einer Krebs-Ringer-Lösung umströmt, die 10 mM Glucose enthielt. Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 μ M Idazoxan zugesetzt, ab Minute 60 zusätzlich 300 μ M Diazoxid. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 40) wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten.

In Abbildung 4.15 ist dargestellt, wie in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration durch 100 μM Alinidin nach 6 Minuten zunächst eine Verdoppelung der Sekretionsrate und nach 20 Minuten praktisch eine Verdreifachung der Sekretionsrate beobachtet werden konnte (biphasischer Verlauf). Vier Minuten nach Exposition mit 300 μM Diazoxid war der Sekretionswert bereits auf 130 % der prästimulatorischen Sekretionsrate gesunken.

In Abbildung 4.16. verursachten 100 μM Idazoxan in Gegenwart von 10 mM Glucose innerhalb von 20 Minuten nur einen Insulinsekretionsanstieg um 50 %. Diese Steigerung der Insulinsekretion konnte durch 300 μM Diazoxid innerhalb von drei Minuten vollständig antagonisiert werden.

Phentolamin hingegen induzierte in einer Konzentration von 100 μM in Gegenwart von 10 mM Glucose einen verzögerten, stark ausgeprägten Sekretionsanstieg auf 1300 % (Abb. 4.17.).

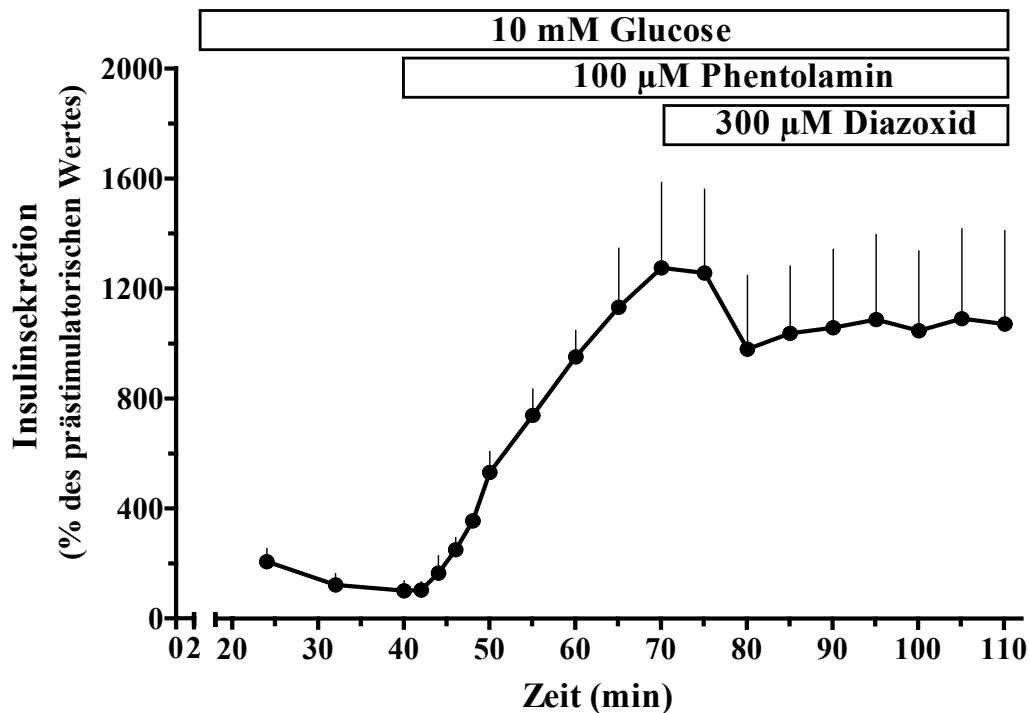


Abb. 4.17.: Fehlender antagonisierender Effekt von Diazoxid auf die Phentolamin-induzierte Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus. Die Inseln wurden von Minute 0 bis 110 mit einem KR-Medium umströmt, das 10 mM Glucose enthielt. Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 μM Phentolamin zugesetzt, ab der Minute 70 zusätzlich 300 μM Diazoxid. Dargestellt sind die Insulinsekretionsraten in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 40) wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM ($n=3$).

Durch 300 μM Diazoxid ergab sich eine Absenkung von 1300 % auf 920 % innerhalb von 10 Minuten, danach blieb die Sekretionsrate erhöht bei ca. 1000 %. Dieses geringe Ausmass der Reduktion war jedoch für einen signifikanten Unterschied ausreichend.

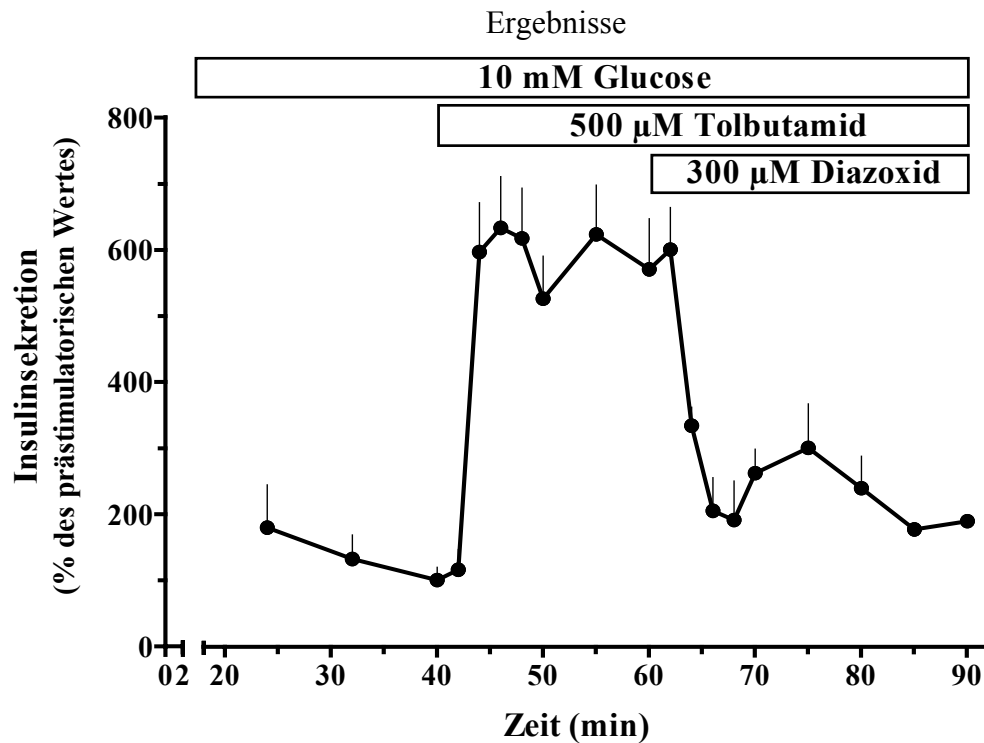


Abb. 4.18.: Unvollständiger antagonisierender Effekt von Diazoxid auf den Tolbutamid-induzierten Insulinsekretionsanstieg in Pankreasinseln der Maus. Die Inseln wurden von Minute 0 bis 90 mit einem KR-Medium umströmt, das 10 mM Glucose enthielt. Ab Minute 40 wurde dem Medium 500 μ M Tolbutamid zugesetzt, ab Minute 60 zusätzlich 300 μ M Diazoxid. Dargestellt sind Insulinsekretionsraten in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 40) wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelerperimenten.

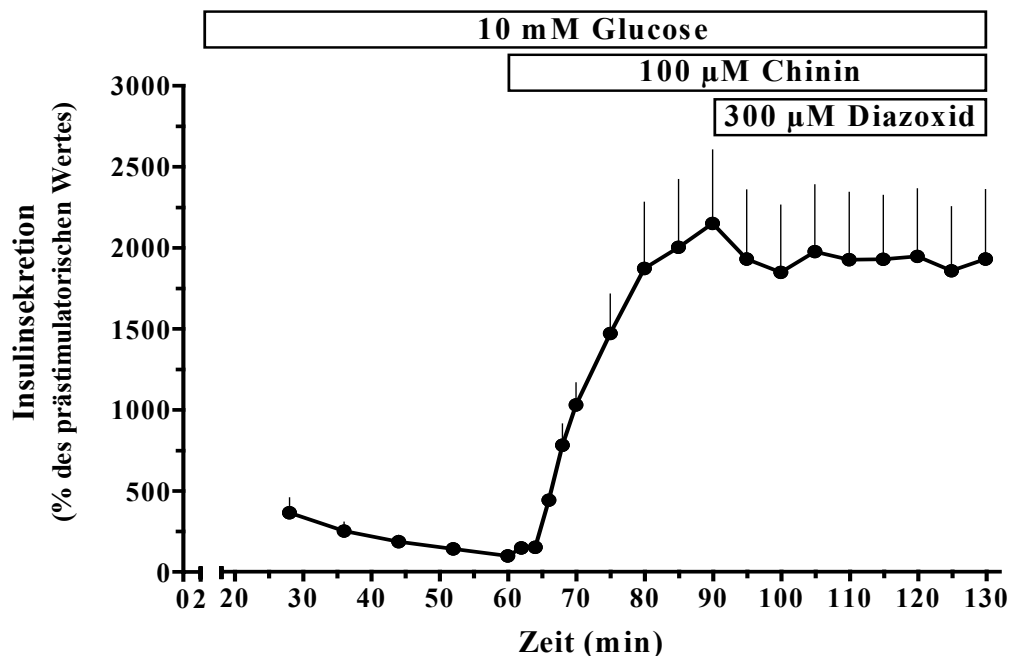


Abb. 4.19.: Fehlender antagonisierender Effekt von Diazoxid auf den Chinin-induzierten Insulinsekretionsanstieg in Pankreasinseln der Maus. Die Inseln wurden von Minute 0 bis 130 mit einem KR-Medium umströmt, das 10 mM Glucose enthielt. Ab Minute 60 wurde diesem Medium 100 μ M Chinin zugesetzt, ab Minute 90 zusätzlich 300 μ M Diazoxid. Dargestellt sind Insulinsekretionsraten in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 60) wurde auf 100 % gesetzt. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 5 Einzelerperimenten.

Die Vergleichssubstanz Tolbutamid (500 μM) verursachte in Gegenwart von 10 mM Glucose einen schnellen Anstieg der Sekretionsrate um 500 % (Abb. 4.18.). Dieser Tolbutamid-induzierte Effekt auf die Insulinsekretion wurde durch 300 μM Diazoxid nur unvollständig antagonisiert, der prästimulatorische Ausgangswert konnte nicht wieder erreicht werden.

Wie in der Abbildung 4.19. dargestellt, verursachte die Vergleichssubstanz Chinin in einer Konzentration von 100 μM in Gegenwart von 10 mM Glucose einen nahezu kontinuierlichen Sekretionsanstieg bis auf 2200 % (Abb. 4.19.). Diese Steigerung der Sekretionsrate konnte durch 300 μM Diazoxid nicht antagonisiert werden.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Insulinsekretion in Pankreasinseln durch alle Testsubstanzen gemäss folgender Rangfolge stimuliert werden konnte: Idazoxan \ll Efaroxan = Alinidin $<$ Phentolamin. Diazoxid antagonisierte nur den Effekt von Idazoxan, Alinidin und Efaroxan, nicht aber den Effekt von Phentolamin. Auffallend war dabei das schnelle Eintreten des antagonisierenden Effektes. Dahingegen stellte sich der Effekt für den Antagonismus von Tolbutamid nicht so dar, hier konnte erst nach einer gewissen Zeit eine unvollständige antagonisierende Wirkung beobachtet werden.

4.2.2 Grundlegende Charakterisierung des Imidazolineffektes auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus

Um die Bedeutung des „*triggering pathways*“ und insbesondere die des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals für die Insulinsekretionssteigerung durch Imidazoline weiter aufzuklären, wurden die Effekte von Efaroxan, Alinidin, Phentolamin und RX871024 vergleichend charakterisiert. In den folgenden Kapiteln wurde zur Veranschaulichung der experimentellen Befunde von nahezu jeder Versuchsreihe ein Mittelwert und ein Einzelexperiment dargestellt. Ziel war es, durch die Darstellung des Einzelexperiments die Induktion cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen durch bestimmte Testsubstanzen zu belegen, während mit Hilfe der Darstellung der Mittelwerte vor allem eine Dokumentation unter quantitativen Gesichtspunkten erfolgen sollte.

4.2.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Efaroxan-induzierten intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration in Pankreasinseln der Maus

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Mausinseln - induziert durch 10 μM Efaroxan - in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration untersucht (Abb. 4.20.).

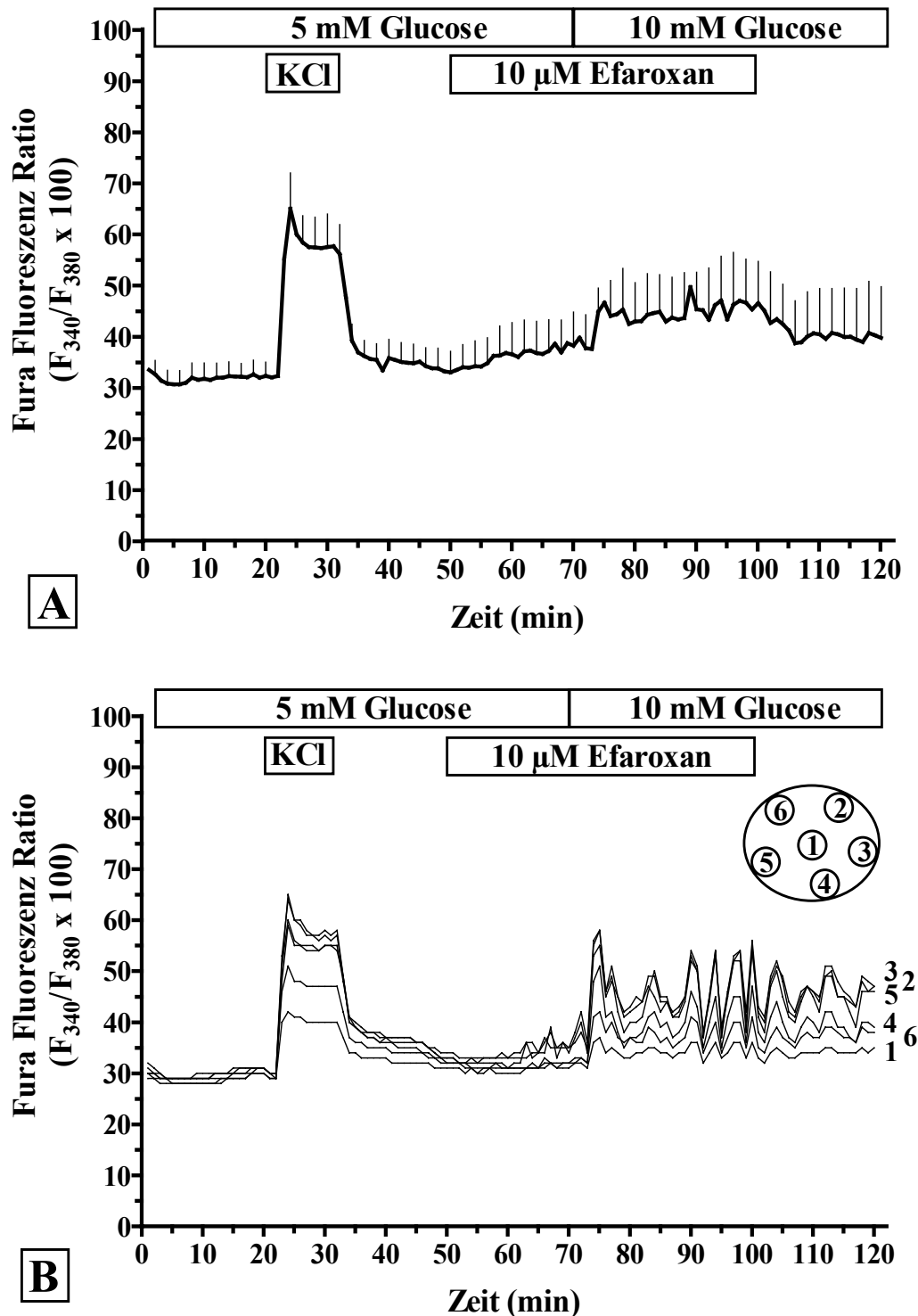


Abb. 4.20.: Minimale calciumerhöhende Wirkung des Efaroxans in Gegenwart von Glucose. Eine kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 10 μ M Efaroxan umströmt (Minute 50-100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 10 μ M Efaroxan wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Ergebnisse

Es wurde dabei dasselbe experimentelle Protokoll wie bereits in Abbildung 4.7. dargestellt verwendet. Wie der Kurvenverlauf des Mittelwertes in Abbildung 4.20.A. zeigt, konnten zu Beginn der Perifusion in Gegenwart von 5 mM Glucose Ratio-Werte um 32 gemessen werden. Die Umströmung der Pankreasinseln mit einer stark depolarisierend wirkenden K^+ -Konzentration (44,7 mM) führte innerhalb von drei Minuten zur Induktion eines Ca^{2+} -Peaks von Ratio-Werten um 32 auf Ratio-Werte um 65. Nach zwei Minuten kam es zu einem Rückgang der $[Ca^{2+}]_i$ und es bildete sich ein Plateau aus, dessen Ratio-Wert bei 58 lag und fünf Minuten anhielt. Nach Absenkung der K^+ -Konzentration auf Ausgangskonzentration (4,7 mM) sank die $[Ca^{2+}]_i$ sehr schnell fast bis auf den Ausgangswert zurück (Ratio 34). In Gegenwart von 5 mM Glucose konnte durch 10 μ M Efaroxan nach einer Latenzzeit von 8 Minuten ein sehr geringer Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verursacht werden (Ratio 38 - 40). Durch Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM - bei fortdauernder Anwesenheit von 10 μ M Efaroxan - konnte ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol von schneller Kinetik induziert werden (Ratio 46), der aber etwas geringer war als derjenige induziert durch die K^+ -Depolarisation (Ratio 58). Wie das Kurvenprofil des Einzelexperiments in Abbildung 4.20.B. belegt, konnten in dieser Expositionsphase synchrone und niederfrequente ($x_{(n=4)}=0,23/\text{min}$) cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen induziert werden. Die Spitzenwerte dieser Oszillationen erreichten dabei Ratio-Werte um 58. Über die Insel verteilt konnte das Ausmass der Amplitudengrößen der einzelnen Oszillationen in den einzelnen Experimenten durchaus unterschiedlich sein, die Oszillationen von ROI 1 wiesen dabei häufig die geringsten absoluten Ratio-Werte auf. In ideal gekoppelten Pankreasinseln aber entwickelten sich dann insbesondere synchrone und regelmässige Oszillationen, deren Maxima und Minima über die gesamte Insel verteilt gleich groß waren (s. Abb. 4.21.B.). Wie in Abbildung 4.20.A. dargestellt konnte in der Auswaschphase lediglich ein leichter Rückgang der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden, es entwickelte sich in Gegenwart von 10 mM Glucose sogar ein steady state (Ratio 39). Auch cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen waren zu sehen (Abb. 4.20.B.), deren Frequenz aber im Vergleich zu den Glucose-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen des Kontrollexperiments (Abb. 4.4.) etwas abnahm ($x_{(n=4)}=0,2/\text{min}$).

Zur Perifusion einer Pankreasinsel, die der Untersuchung der Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration induziert durch 100 μ M Efaroxan in Abhängigkeit substimulatorischer (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration diente, wurde dasselbe experimentellen Protokoll eingesetzt, das bereits in Abbildung 4.20. dargestellt wurde.

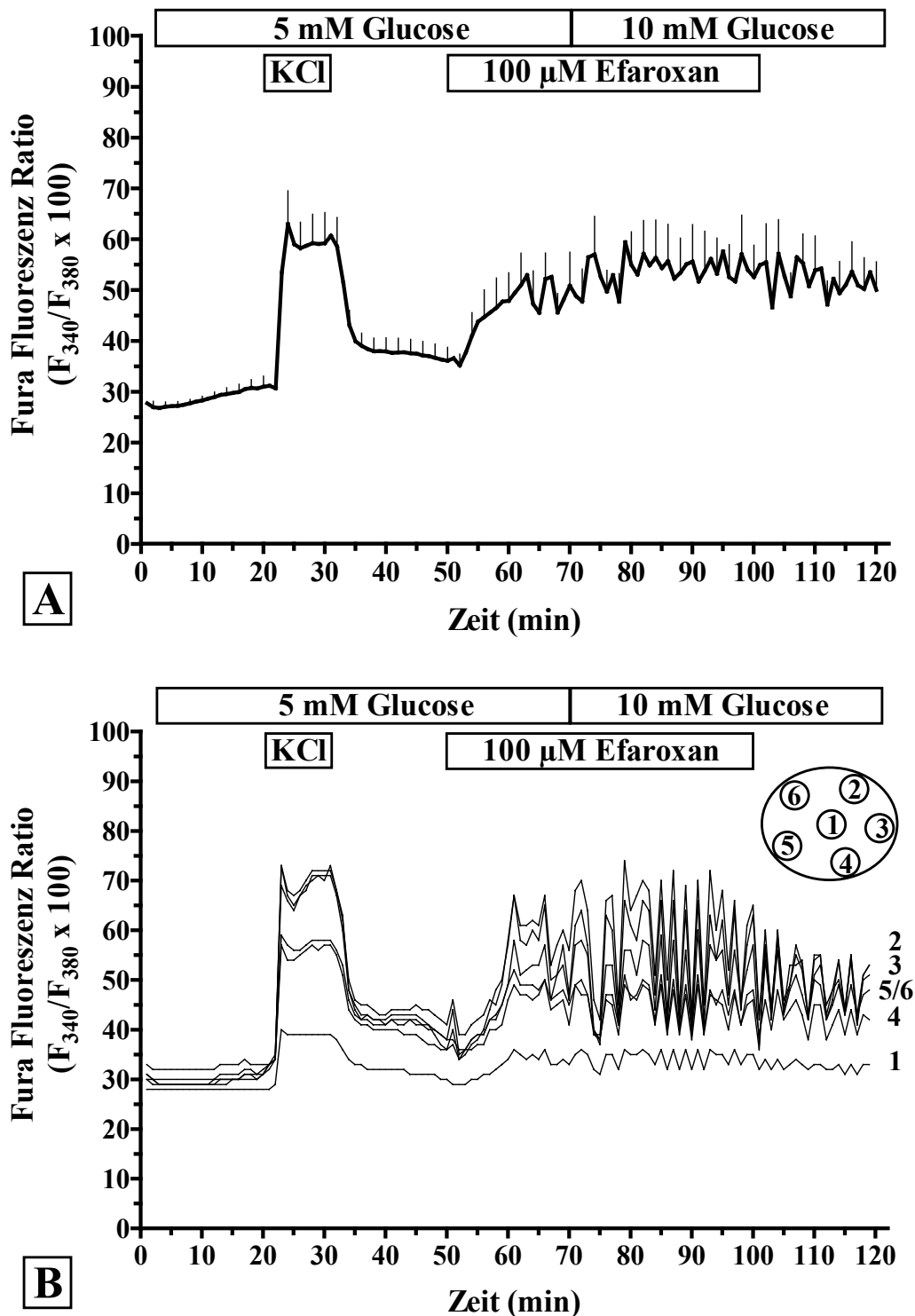


Abb. 4.21.: Calcium erhöhende Wirkung des Efaroxans in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 100 μ M Efaroxan umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μ M Efaroxan wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 6 Einzelerperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelerperiment. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Ergebnisse

Wie im Kurvenprofil des Mittelwertes belegt (Abb. 4.21.A.), führte die Exposition mit 100 μM Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose zu einem prompt einsetzenden kontinuierlichen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Der Anstieg der Ratio-Werte innerhalb von 10 Minuten erfolgte von 35 auf maximale Ratio-Werte um 51, ähnlich wie die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration induziert durch eine K^{+} -Depolarisation von Ratio-Werten um 30 auf Ratio-Werte um 58 (Plateau). Im Kurvenprofil des Einzelexperiments (Abb. 4.21.B.) ist dokumentiert, dass in Gegenwart von 100 μM Efaroxan cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen entstehen: nach einer Latenzzeit von 8 Minuten treten bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose - mit Ausnahme von ROI 1 - synchrone und niederfrequente ($x_{(n=6)}=0,14/\text{min}$) Oszillationen in nahezu regelmässigen Abständen auf. Die Spitzenwerte dieser Oszillationen in Gegenwart von 5 mM Glucose erreichten Ratio-Werte bis 66 (ROI 2), d. h. Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte, die auch während der K^{+} -Depolarisation zu beobachten waren. Im weiteren Verlauf der Perifusion wurde die Glucosekonzentration - bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μM Efaroxan - von 5 mM auf 10 mM erhöht. Wie im Mittelwert belegt erfolgte durch diese Erhöhung ein geringfügiger Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Ratio-Werten um 50 auf Ratio-Werte um 55. Im Kurvenverlauf des Einzelexperiments konnten Veränderungen im oszillatorischen Muster gezeigt werden: die Frequenz der Oszillationen nahm zu ($x_{(n=6)}=0,31/\text{min}$). In der Auswaschphase schliesslich konnte kein nennenswerter Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Pankreasinsel beobachtet werden (Abb. 4.21.A.), der Spitzenwert der Oszillationen sank zwar leicht ab, es konnten aber immer noch maximale Ratio-Werte von 55 beobachtet werden.

Durch 500 μM Efaroxan wurde in Anwesenheit von 5 mM Glucose ein schneller, aber nur mässiger Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration von Ratio-Werten um 32 auf Ratio-Werte um 43 ausgelöst (Abb. 4.22.A.). Im Vergleich zur vorausgehenden K^{+} -Depolarisation, die - erneut verwendet als interner Standard - in diesen Experimenten etwas geringer ausgeprägt war (Ratio 48), ist das Ausmass dieses Efaroxan-induzierten Effektes nicht notwendigerweise geringer als das Ausmass induziert durch 100 μM Efaroxan (Abb. 4.21.). Wie im Kurvenprofil des Einzelexperiments belegt (Abb. 4.22.B.), entwickelten sich keine cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, stattdessen war eine langanhaltende Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol die Folge. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM zeigte sich im Kurvenverlauf des Einzelexperiments eine kurzfristige Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, an der alle regions of interest der Pankreasinsel beteiligt waren (Ratio 32). Im Anschluss daran stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder an. Die im Mittelwert dargestellte Erhöhung in Gegenwart von 10 mM Glucose und Efaroxan erreichte Ratio-Werte um 43.

Ergebnisse

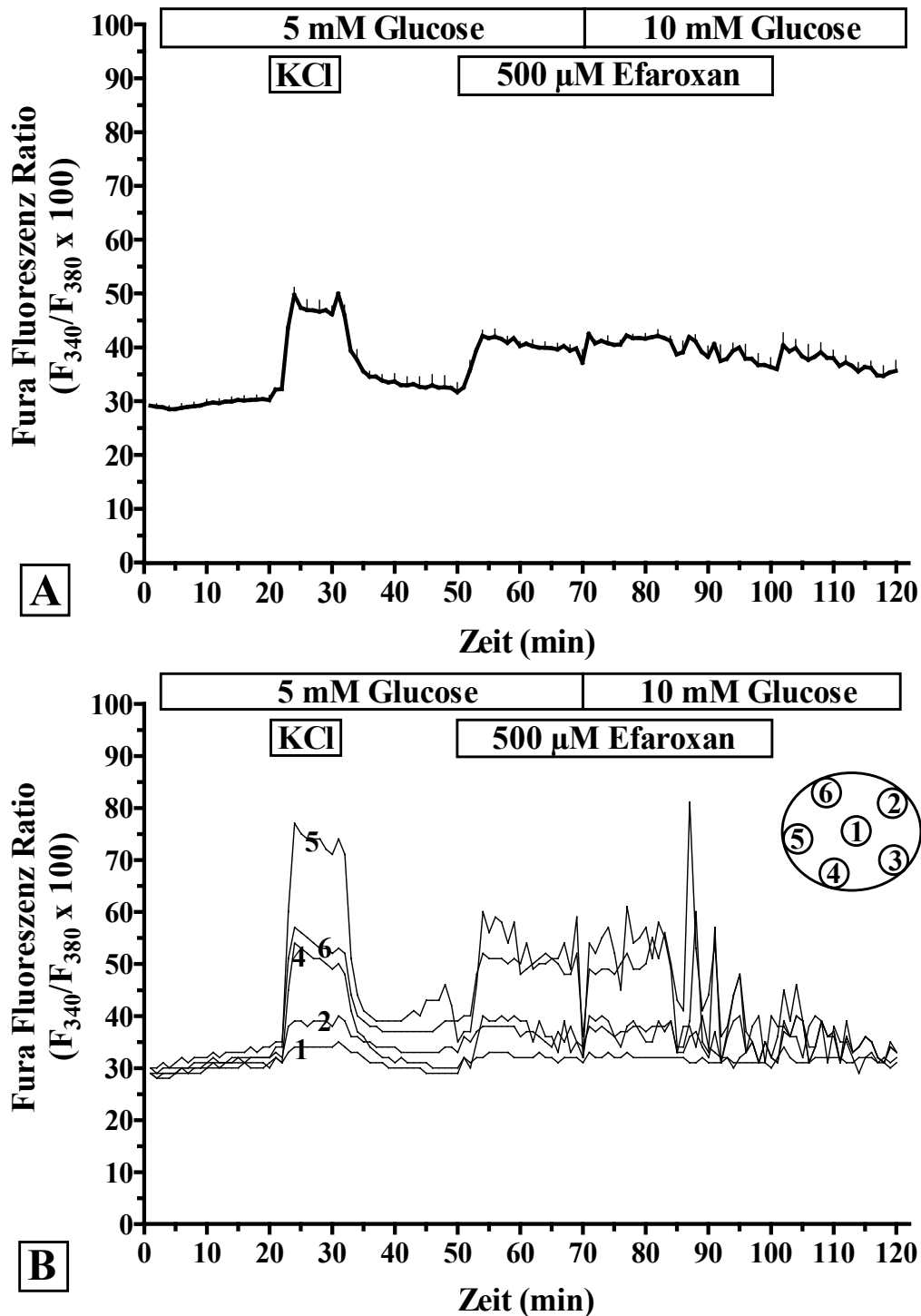


Abb. 4.22.: Wirkung von 500 μM Efaroxan in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 500 μM Efaroxan umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 500 μM Efaroxan wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelerperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelerperiment. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

In der Auswaschphase konnte ein leichter kontinuierlicher Abfall der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden (Abb. 4.22.B.), obgleich 10 mM Glucose präsent waren. Es

bildeten sich interessanterweise in dieser Auswaschphase auch keine typischen synchronen Glucose-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen (vergl. Abb. 4.4.) mehr aus.

Um den Unterschied zwischen dem Effekt von 100 μM Efaroxan und 500 μM Efaroxan herauszuarbeiten, wurde folgendes experimentelles Protokoll durchgeführt:

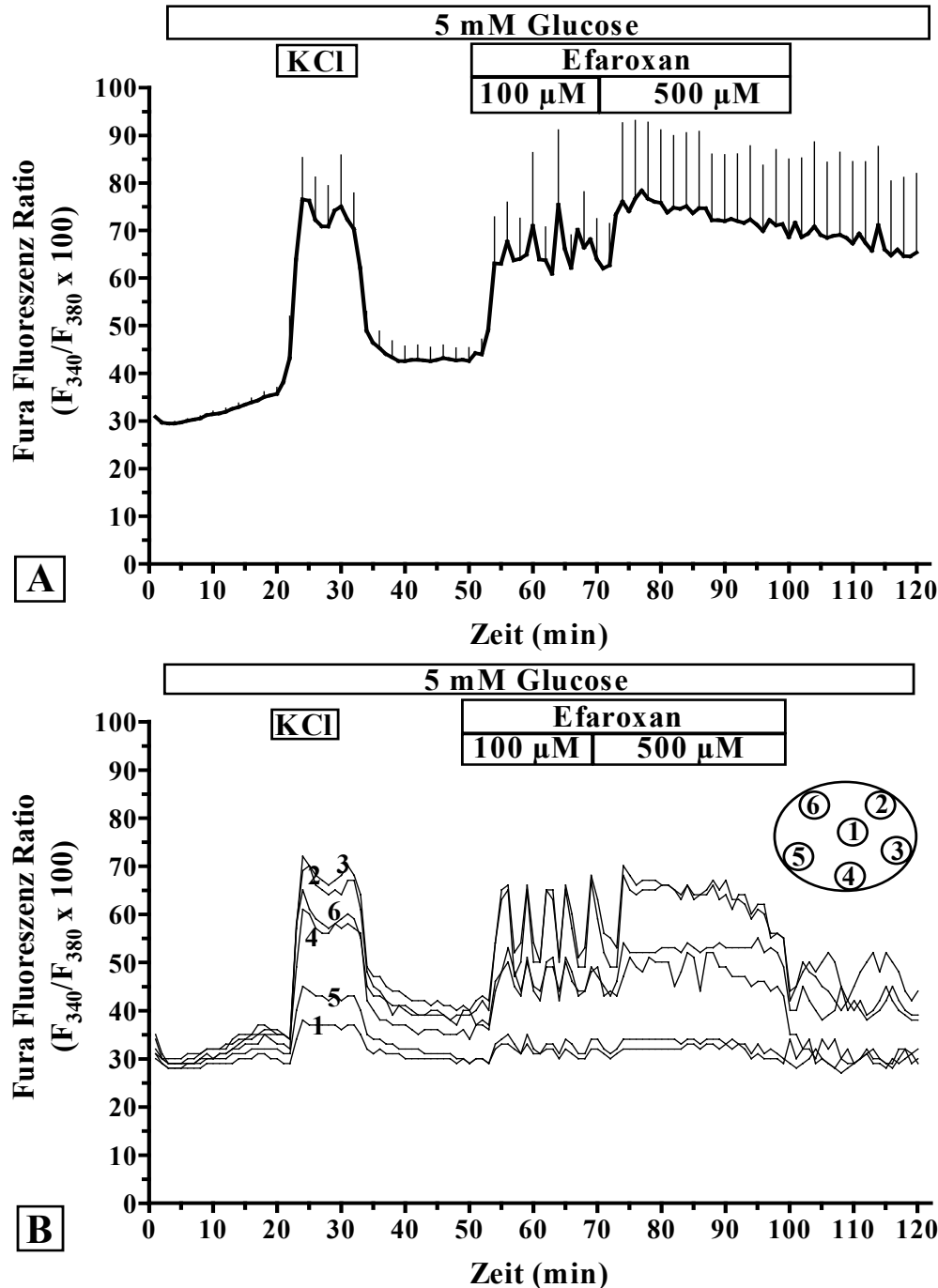


Abb. 4.23.: Direkter Vergleich der calciumerhöhenden Wirkung zweier Efaroxan-Konzentrationen in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde von Minute 0 bis 120 mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt. Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 100 μM Efaroxan umströmt (Minute 50-70). Ab Minute 70 wurde dann 30 Minuten mit 500 μM Efaroxan perfundiert. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Ergebnisse

Der direkte Vergleich beider Effekte in Gegenwart von 5 mM Glucose bestätigte die bisherigen experimentellen Befunde: 1. Die durch 100 μM Efaroxan induzierte Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration entsprach weitgehend derjenigen Erhöhung verursacht durch eine K^{+} -Depolarisation. 2. Es konnten in dieser Expositionsphase erneut die charakteristischen synchronen, in regelmässigen Abständen auftretenden und niederfrequenten ($x_{(n=4)}=0,19/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen registriert werden. 3. Das Ausmass des Anstiegs der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Erhöhung der Efaroxan-Konzentration von 100 μM auf 500 μM war nicht vermindert, da sich das Plateau der jeweiligen ROI's auf dem Niveau der jeweiligen Amplitudenmaxima befand. 4. Mit 500 μM Efaroxan entwickelte sich eine langanhaltende Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ohne oszillatorisches Muster. 5. Mit Auswaschen von 500 μM Efaroxan kam es in Gegenwart von 5 mM Glucose zum Rückgang der $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Es wurde auch überprüft, ob der durch 100 μM Efaroxan induzierte Effekt durch 300 μM Diazoxid antagonisiert werden konnte (Abb. 4.24.). Es konnte belegt werden, dass sich der durch Efaroxan induzierte Effekt durch 300 μM Diazoxid innerhalb von zwei Minuten vollständig antagonisieren liess.

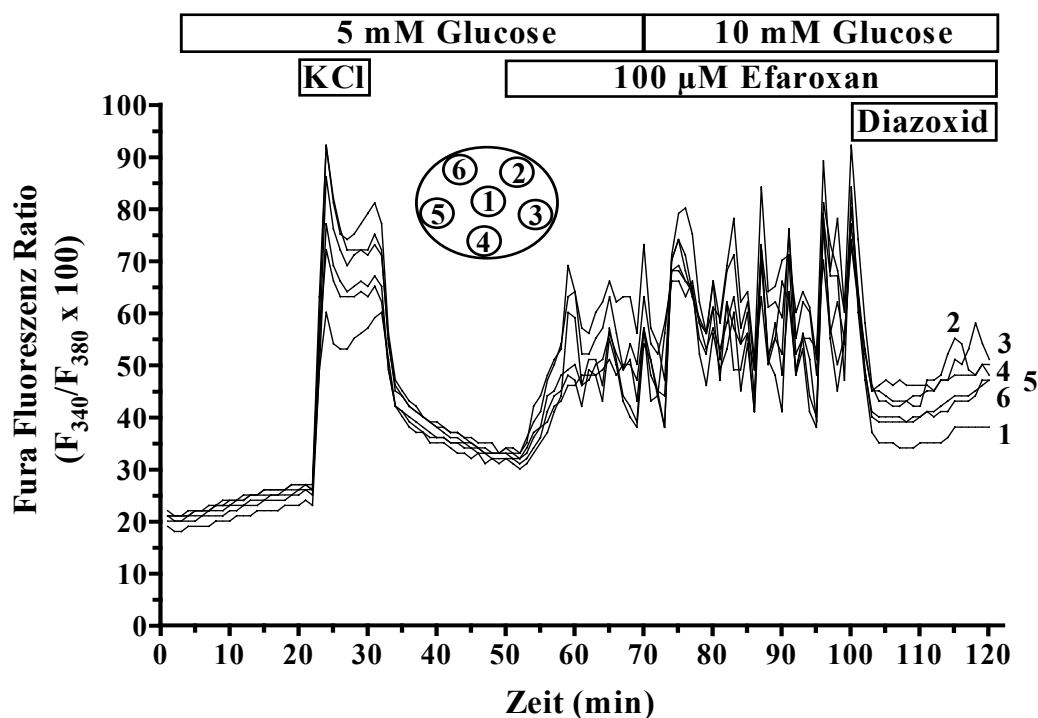


Abb. 4.24.: Antagonisierender Effekt von Diazoxid auf den Efaroxan-induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^{+} für 10 Minuten wurde die Insel mit 100 μM Efaroxan umströmt (Minute 50-120). Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μM Efaroxan wurde die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht (Minute 70). Ab Minute 100 wurde dem Medium dann 300 μM Diazoxid zugesetzt. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzel-experiment, das repräsentativ ist für 4 weitere Experimente.

4.2.2.2 Der Effekt von 100 μM Efaroxan auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus in Gegenwart von α -Ketoisocapronsäure

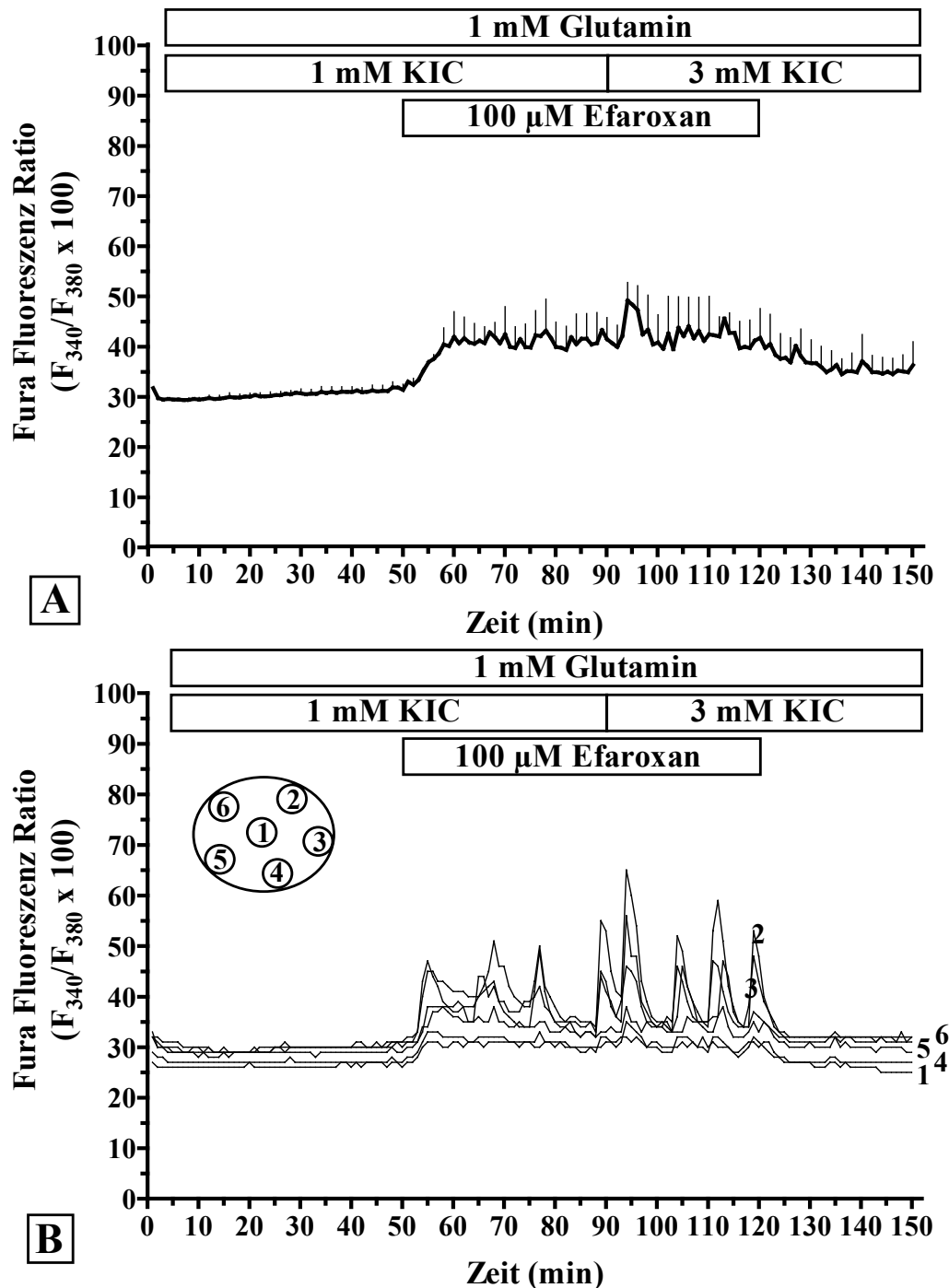


Abb. 4.25.: Der Efaroxan-induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Gegenwart von α -Ketoisocapronsäure (KIC). Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde während der gesamten Expositionsphase (Minute 0-150) mit KR-Medium, das 1 mM Glutamin enthielt, umströmt. Minute 0 bis 90 wurde diesem Medium 1 mM KIC zugesetzt. Ab Minute 50 begann die Exposition mit 100 μM Efaroxan (Minute 50-120). Bei fortwährender Anwesenheit von 100 μM Efaroxan wurde in der Minute 90 die KIC-Konzentration auf 3 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit (min) dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM ($n=3$) abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

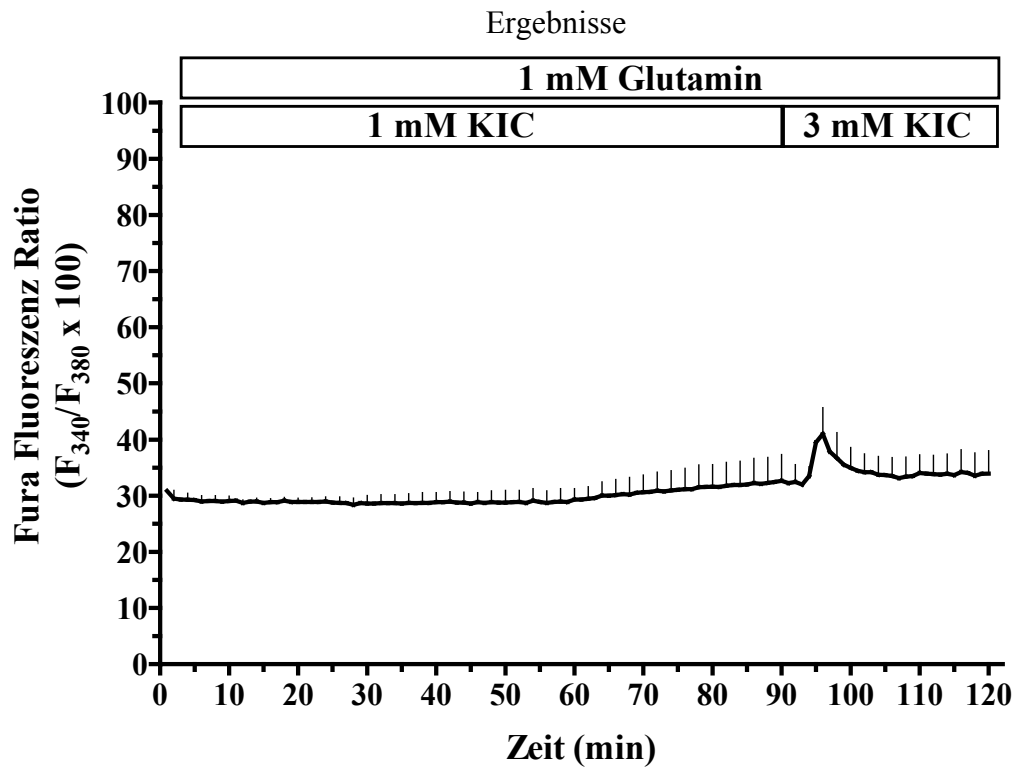


Abb. 4.26.: Kontrollexperiment zum Efaroxan-induzierten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol in Gegenwart von α -Ketoisocapronsäure (KIC). Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde während der gesamten Expositionsphase (Minute 0 bis 120) mit KR-Medium, das 1 mM Glutamin enthielt, umströmt. Minute 0 bis 90 wurde diesem Medium 1 mM KIC zugesetzt. In der Minute 90 wurde die KIC-Konzentration auf 3 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Es ist ein Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelerperimenten dargestellt. Die umströmten Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

In dieser Versuchsreihe wurden die Langerhans'schen Inseln der Maus nicht mit Glucose als Nährstoff perifundiert, sondern mit α -Ketoisocapronsäure (KIC) und Glutamin. Die Konzentration von KIC wurde zur Minute 90 von 1 mM auf die gering stimulatorische Konzentration von 3 mM heraufgesetzt, analog dem Wechsel von 5 mM auf 10 mM Glucose.

Wie im Kurvenprofil des Mittelwertes dargestellt (Abb. 4.25.A.) konnte in Gegenwart von 1 mM Glutamin und 1 mM KIC ein konstanter Ausgangswert (Ratio 30) registriert werden. Nach Beginn der Exposition mit 100 μM Efaroxan stieg die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration innerhalb von 8 Minuten an (Ratio 40). In dieser Expositionsphase entwickelten sich - wie im Kurvenprofil des Einzelerperiments dargestellt (Abb. 4.25.B.) - niederfrequente ($x_{(n=3)}=0,12/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen aus. Diese Oszillationen waren nicht immer synchron und in bestimmten Bereichen der Pankreasinsel (ROI 1 und 4) konnten keine Oszillationen beobachtet werden. Nach Erhöhung der KIC-Konzentration auf 3 mM - bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μM Efaroxan - konnte innerhalb von zwei Minuten eine kurzfristige Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Ratio-Werte um 48 verzeichnet werden. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sank dann schnell wieder ab. Ein solch kurzfristiger Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte auch im Kontroll-experiment nach Erhöhung der KIC-Konzentration von 1 mM auf 3 mM beobachtet werden

(Abb. 4.26). Wie in Abbildung 4.25.B. dargestellt konnte in Gegenwart von 100 μM Efaroxan durch Erhöhung der KIC-Konzentration von 1 mM auf 3 mM eine Zunahme der Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen ähnlich wie in Gegenwart von Glucose (s. Abb. 4.21.B.) auf $x_{(n=3)} = 0,25/\text{min}$ beobachtet werden. Interessanterweise war der durch Efaroxan induzierte Effekt in Gegenwart von KIC in der Auswaschphase des Imidazolins innerhalb von 15 Minuten vollständig reversibel.

4.2.2.3 Die Phentolamin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration in Pankreasinseln der Maus

Um auch den Effekt von Phentolamin mit demjenigen des Efaroxans auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln vergleichen zu können und damit zur Klärung der unterschiedlichen Wirkprinzipien beider Imidazoline beitragen zu können, wurde dasselbe experimentelle Protokoll, wie es schon zur Untersuchung des Efaroxan-induzierten Effektes verwendet wurde (s. Abb. 4.21.), eingesetzt.

Wie im Kurvenprofil des Mittelwertes (Abb. 4.27.A.) dargestellt stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Pankreasinseln in Gegenwart basaler Glucosekonzentration (5 mM) durch 100 μM Phentolamin von Ratio-Werten um 40 auf Ratio-Werte um 58 an. Dieser Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol entsprach dabei demjenigen Anstieg induziert durch 44,7 mM Kaliumchlorid. Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μM Phentolamin kam es dann nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM zu einer kurzfristigen Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Ratio 46). Wie das Kurvenprofil des Einzelexperiments zeigt (Abb. 4.27.B.) konnte eine solche Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in allen Teilbereichen der umströmten Pankreasinsel (ROI's) beobachtet werden. Des weiteren zeigt dieses Kurvenprofil, dass die Niveaus der einzelnen Teilbereiche über die Insel verteilt unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Auch konnten nur in zwei von vier Einzelexperimenten das auch in Abbildung 4.27.B. dargestellte leicht oszillatorische Muster beobachtet werden. In den anderen zwei Einzelexperimenten konnte lediglich ein langanhaltender Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration registriert werden (Grafiken nicht dargestellt). In der Auswaschphase wurde der Phentolamin-induzierte Effekt nicht ausgesetzt.

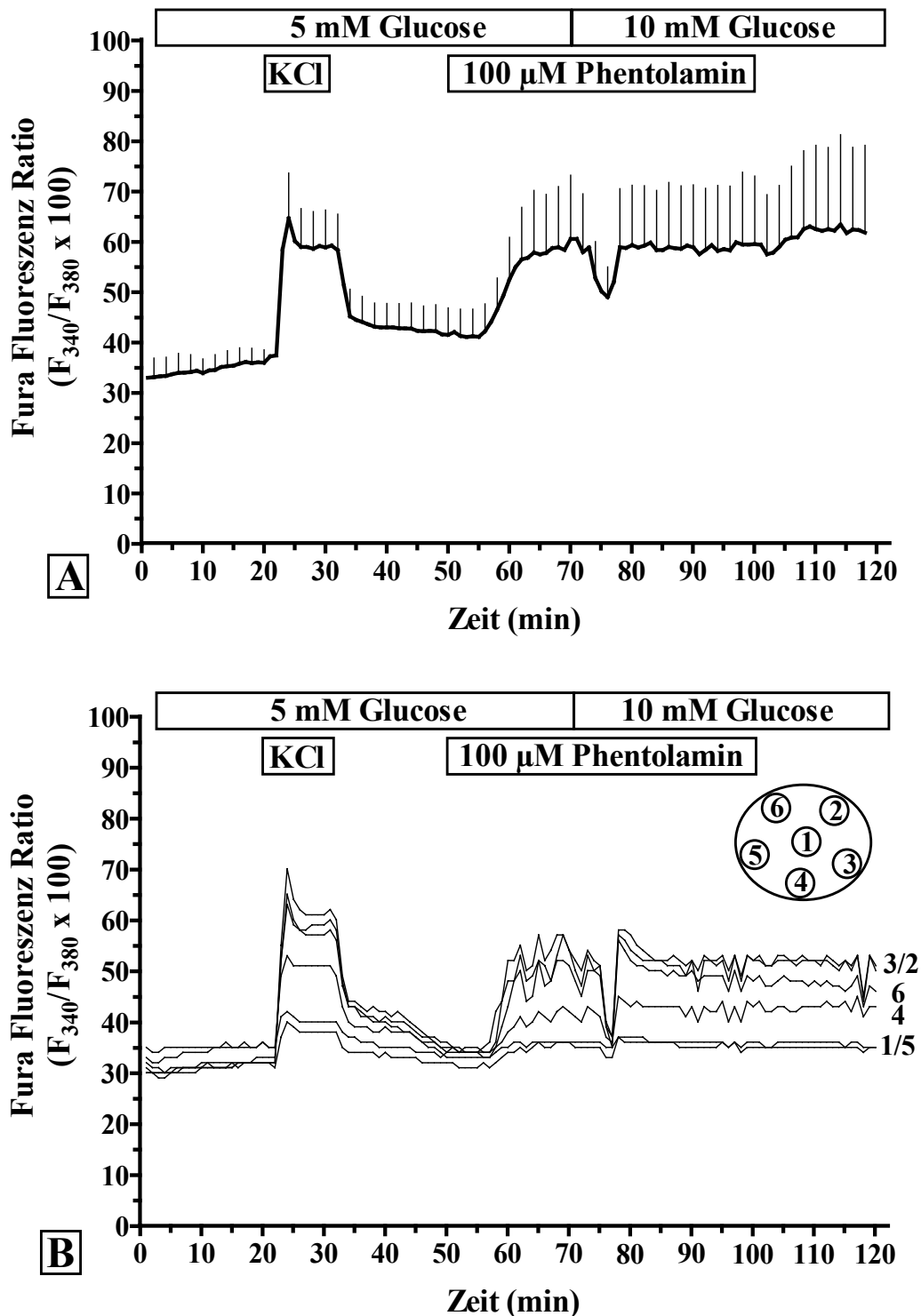


Abb. 4.27.: Calciomerhöhende Wirkung des Phentolamins in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 100 μ M Phentolamin umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μ M Phentolamin wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

4.2.2.4 Die Alinidin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration in Pankreasinseln der Maus

Das Imidazolin Alinidin zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass es nahezu keinen α_2 -antagonistischen Effekt ausübt und seine Wirkung nahezu unmittelbar eintritt (Jonas et al., 1992; Rustenbeck et al., 1997a). Zur Untersuchung des Alinidin-induzierten Effektes auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus wurde dasselbe experimentelle Protokoll verwendet, das auch zur Prüfung des Efaroxan-induzierten Effektes eingesetzt wurde (s. Abb. 4.21.). Wie in Abbildung 4.28.A. dargestellt startete der Ausgangswert des Mittelwertes bei Ratio-Werten um 25 und stieg dann auf Ratio-Werte um 33 an. Durch eine depolarisierend wirkende K^+ -Konzentration (44,7 mM) konnte dann - nach kurzfristigem leichten Abfall - ein steiler Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgelöst werden. Nach dem Aussetzen der Exposition mit der hohen K^+ -Konzentration konnten wieder Ratio-Werte nahe des Ausgangswertes erreicht werden (Ratio 38). Bei fortdauernder Anwesenheit von 5 mM Glucose induzierten 100 μM Alinidin - nach kurzfristigem leichten Abfall - einen steilen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Ratio-Werten um 32 auf Ratio-Werte um 60. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM - bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μM Alinidin - änderten sich die Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte nicht wesentlich (Ratio 62). Nach dem Aussetzen der Exposition mit 100 μM Alinidin konnte im Kurvenverlauf des Mittelwertes nahezu keine Reversibilität beobachtet werden, ein überhängender Effekt des Imidazolins Alinidin ist in Gegenwart von 10 mM Glucose - ähnlich wie beim Efaroxan - recht wahrscheinlich.

Bemerkenswerterweise konnte im Kurvenprofil des Einzelexperiments belegt werden (Abb. 4.28.B.), dass sich in Gegenwart beider Glucosekonzentrationen durch 100 μM Alinidin - ähnlich wie durch 100 μM Efaroxan (s. Abb. 4.21.B.) - synchrone und niederfrequente ($x_{(n=4)} = 0,18/\text{min}$) cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen entwickelten. In Gegenwart von 10 mM Glucose wurde aber keine Erhöhung der Frequenz beobachtet. Die Niveaus der ausgewählten Teilbereiche (ROI's) der Pankreasinsel lagen dabei nahe beieinander. Auffallend war, dass die Minima der Amplituden der Oszillationen der einzelnen ROI's den Ausgangswert von 25 bei weitem nicht erreichten, während die Spitzenwerte der Oszillationen der einzelnen ROI's bei Ratio-Werten über 100 lagen. In der Auswaschphase konnte im Einzelexperiment dann keine wesentliche Veränderung im oszillatorischen Muster registriert werden.

Ergebnisse

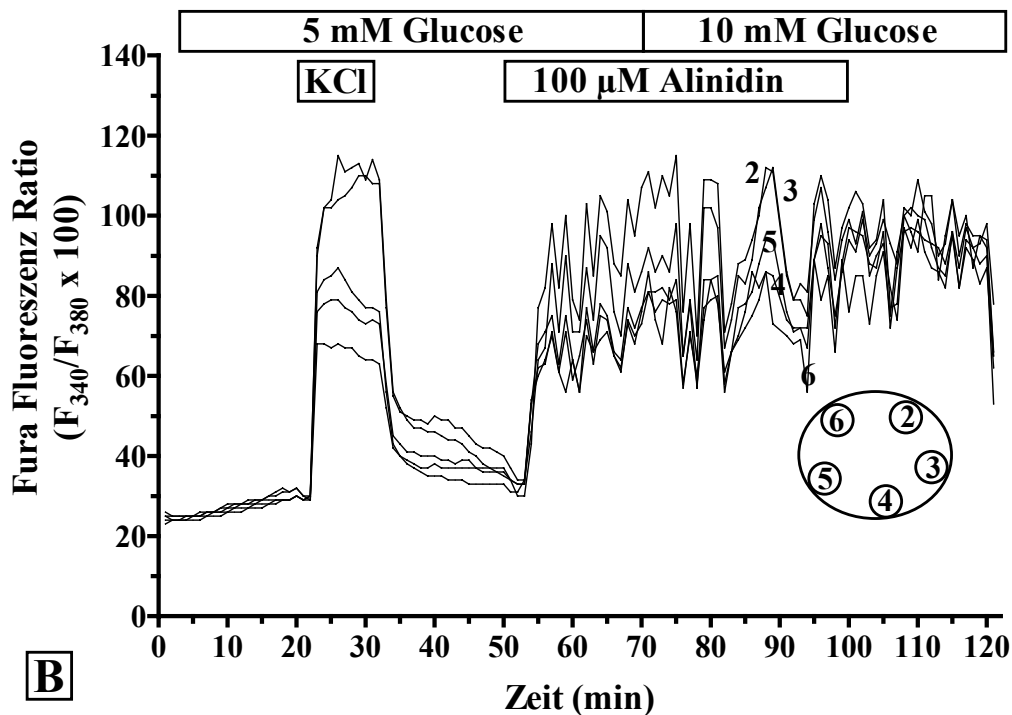
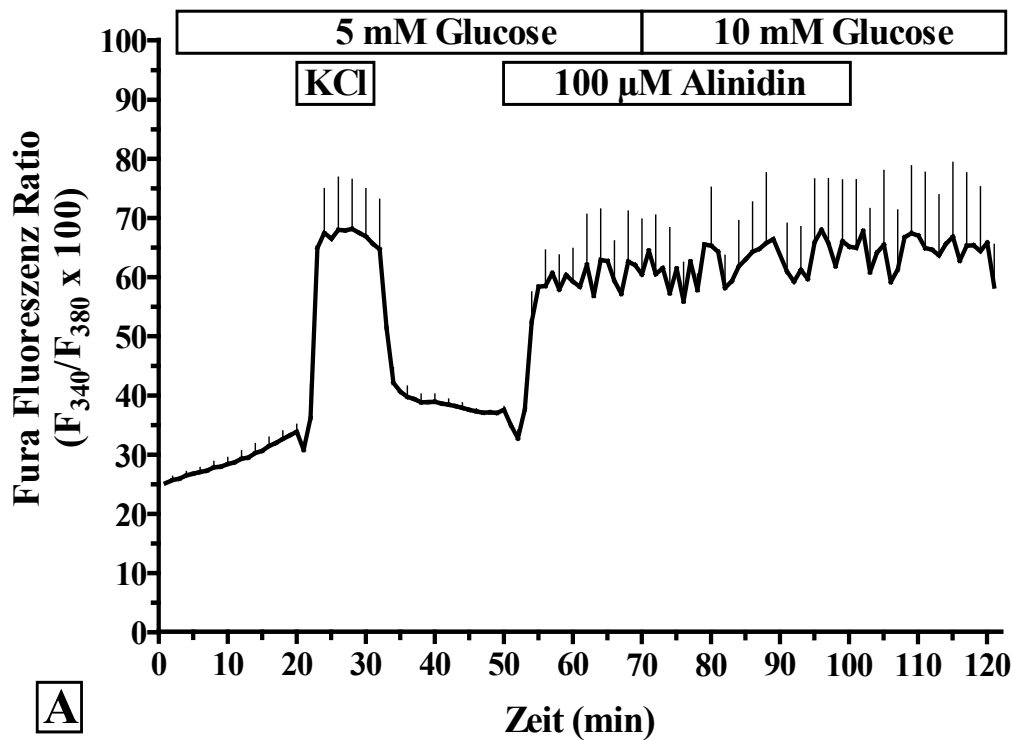


Abb. 4.28.: Calciumerhöhende Wirkung des Alinidins in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 100 μ M Alinidin umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μ M Alinidin wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

4.2.2.5 Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus durch das Imidazolin RX871024 in Anwesenheit von basaler (5 mM) und stimulatorisch wirkender (10 mM) Glucosekonzentration

Es stellte sich die Aufgabe, das insulinotrope Wirkprinzip des Imidazolins RX871024 auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung mit demjenigen des Efaroxans zu vergleichen. Dazu wurde zunächst die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in kultivierten Pankreasinseln durch 10 μM RX871024 in Gegenwart substimulatorischer (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucosekonzentration unter Anwendung des bereits unter Kapitel 4.2.2.1. vorgestellten experimentellen Protokolls (s. Abb. 4.21.) untersucht.

Wie im Kurvenverlauf des Mittelwertes dargestellt (Abb. 4.29.A.), stieg die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der Pankreasinsel in Gegenwart von 5 mM Glucose durch 10 μM RX871024 mit schneller Kinetik an, von Ratio 38 auf Ratio 50. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ verursacht durch eine K^+ -Depolarisation wies ähnliche Ratio-Werte auf. Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration stieg bei Exposition mit 10 μM RX871024 noch weiter kontinuierlich an, gegen Ende dieser Expositionsphase konnten Ratio-Werte um 64 beobachtet werden. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM - bei fortlaufender Anwesenheit von 10 μM RX871024 - kam es ähnlich wie bei Phentolamin zu einer kurzfristigen Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Ratio-Werte um 54. Innerhalb von zwei Minuten stieg die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aber wieder auf Ratio-Werte um 65 an und erreichte in dieser Expositionsphase schliesslich einen maximalen Ratio-Wert von 72. Wie das Kurvenprofil des Einzelexperiments zeigt (Abb. 4.29.B.) blieb die Entwicklung eines ausgeprägten oszillatorischen Musters, wie es bei Exposition mit Efaroxan und Alinidin der Fall war, aus. Diese Beobachtung konnte bei allen drei Einzelexperimenten gemacht werden. Da RX871024 autofluoreszierende Eigenschaften besitzt (s. Abb. 4.9.), ist es möglich, dass ein leicht oszillatorischer Charakter im Kurvenprofil nicht in Erscheinung tritt. Auffallend ist, dass die Niveaus der einzelnen ROI's der Pankreasinsel mit Ausnahme von ROI 1 nahe beieinander lagen. Auch eine kurzfristige Absenkung der Ca^{2+} -Konzentration nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM (Abb. 4.29.A.) konnte im Einzelexperiment beobachtet werden. Nach Aussetzen der Exposition mit RX871024 konnte in beiden Kurvenverläufen eine sehr langsame Reduktion der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration beobachtet werden, wobei der Ausgangswert nicht mehr erreicht wurde.

Ergebnisse

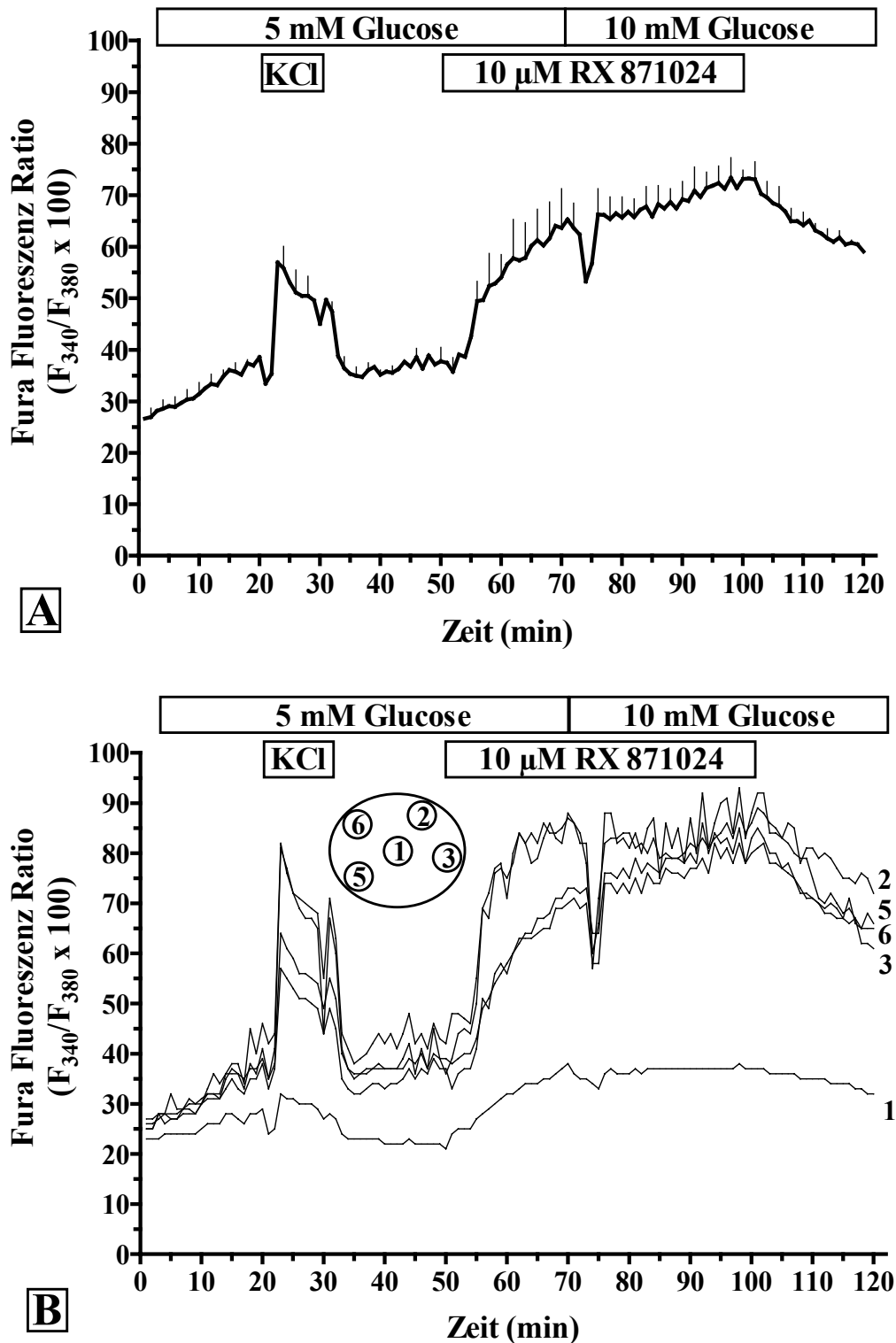


Abb. 4.29.: Calciumerhöhende Wirkung des RX871024 in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 10 μ M RX871024 umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 10 μ M RX871024 wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Zur Dokumentation des Effektes von 100 μM RX871024 auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde wieder dasselbe experimentelle Protokoll eingesetzt (s. Abb. 4.21.). Wie in der Abbildung 4.30. dokumentiert induzierten 100 μM RX871024 bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose nach einer Latenzzeit von nur zwei Minuten einen massiven intrazellulären Anstieg der Fura-Ratio. Mit 10 mM Glucose ergab sich ein träger Abfall um 10 %, danach ein fortdauernder Wiederanstieg, der bis zum Ende der Umströmung keine Sättigung erreichte. Der Anstieg der Fura-Ratio induziert durch 100 μM RX871024 war dabei wesentlich höher als derjenige Anstieg verursacht durch eine K^+ -Depolarisation.

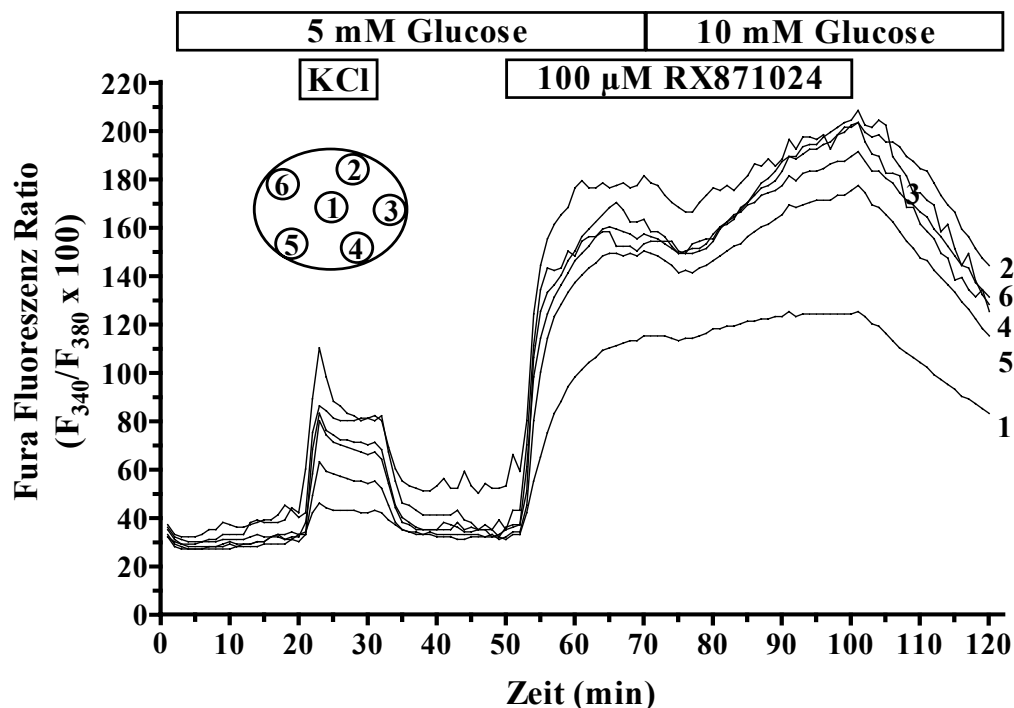


Abb. 4.30.: Massive calcium erhöhende Wirkung von RX871024 in Gegenwart von Glucose. Die mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde mit 100 μM RX871024 umströmt (Minute 50-100). In der Minute 70 wurde bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μM RX871024 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Das Einzelexperiment dokumentiert ein Kurvenprofil, repräsentativ für 4 weitere Experimente.

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass das Imidazolin RX871024 in einer Konzentration von 100 μM eine erhebliche Autofluoreszenz aufweist (Abb. 4.9.), wurden die Ratio-Werte gemessen in der unbeladenen Insel von den Ratio-Werten gemessen in der beladenen Insel subtrahiert (Abb. 4.31.). Wurde anders verfahren, d.h. wurden jeweils die Fluoreszenz-Werte gemessen in der unbeladenen Insel bei 340 nm bzw. 380 nm von den Fluoreszenz-Werten gemessen in der beladenen Insel bei 340 nm bzw. 380 nm voneinander subtrahiert, kam es zu ähnlichen Ergebnissen (Rustenbeck, unveröffentlichte Beobachtungen).

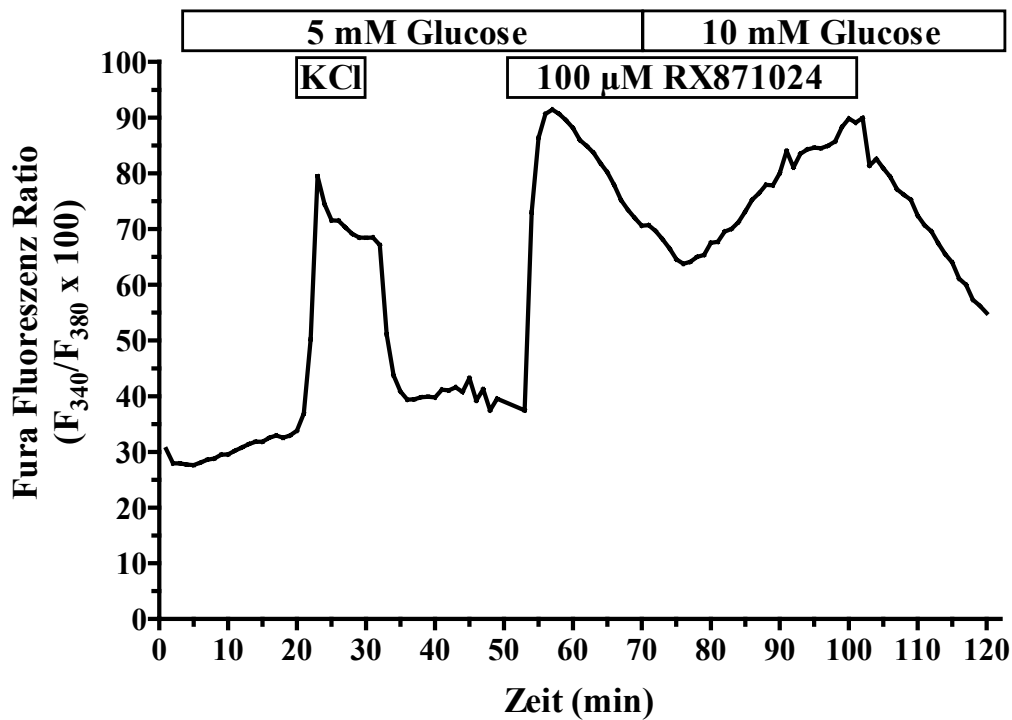


Abb. 4.31.: Subtraktion der Autofluoreszenz von RX871024 von der Fura-Fluoreszenz. Die mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-70). Nach Depolarisation mit 40 mM K⁺ für 10 Minuten wurde mit 100 µM RX871024 umströmt (Minute 50-100). In der Minute 70 wurde bei fortdauernder Anwesenheit von 100 µM RX871024 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Dargestellt ist ein Mittelwert, ermittelt durch Subtraktion der Fura-Ratio-Werte gemessen in der unbeladenen Insel (s. Abb. 4.9.) von den Fura-Ratio-Werten gemessen in der beladenen Insel (s. Abb. 4.30.).

Nach Subtraktion der Autofluoreszenz von der Fura-Fluoreszenz konnte der RX871024-induzierte Ca²⁺-Anstieg im Cytosol - wie in Abbildung 4.31. gezeigt - dargestellt werden: Der durch 100 µM RX871024 induzierte Anstieg der [Ca²⁺]_i in Gegenwart von 5 mM Glucose war im Gegensatz zum Fura-Ratio-Anstieg dargestellt in Abbildung 4.30. nicht mehr sehr viel höher als der [Ca²⁺]_i-Anstieg induziert durch eine K⁺-Depolarisation. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM konnte dann - bei fortdauernder Anwesenheit von 100 µM RX871024 - ein Anstieg der Ratio-Werte verzeichnet werden. In der Auswaschphase sank die cytosolische Ca²⁺-Konzentration wieder schnell ab.

4.2.2.6 Vergleichende Charakterisierung der Wirkung von Tolbutamid und 40 mM K⁺ auf die [Ca²⁺]_i in isolierten Langerhans'schen Inseln der Maus

Zum Vergleich mit dem Imidazolin-induzierten Effekten auf die [Ca²⁺]_i in Pankreasinseln wurden diejenigen Effekte untersucht, die unter gleichen Bedingungen durch den Sulfonylharnstoff Tolbutamid hervorgerufen wurden. Zunächst wurde Tolbutamid in einer Konzentration von 50 µM eingesetzt.

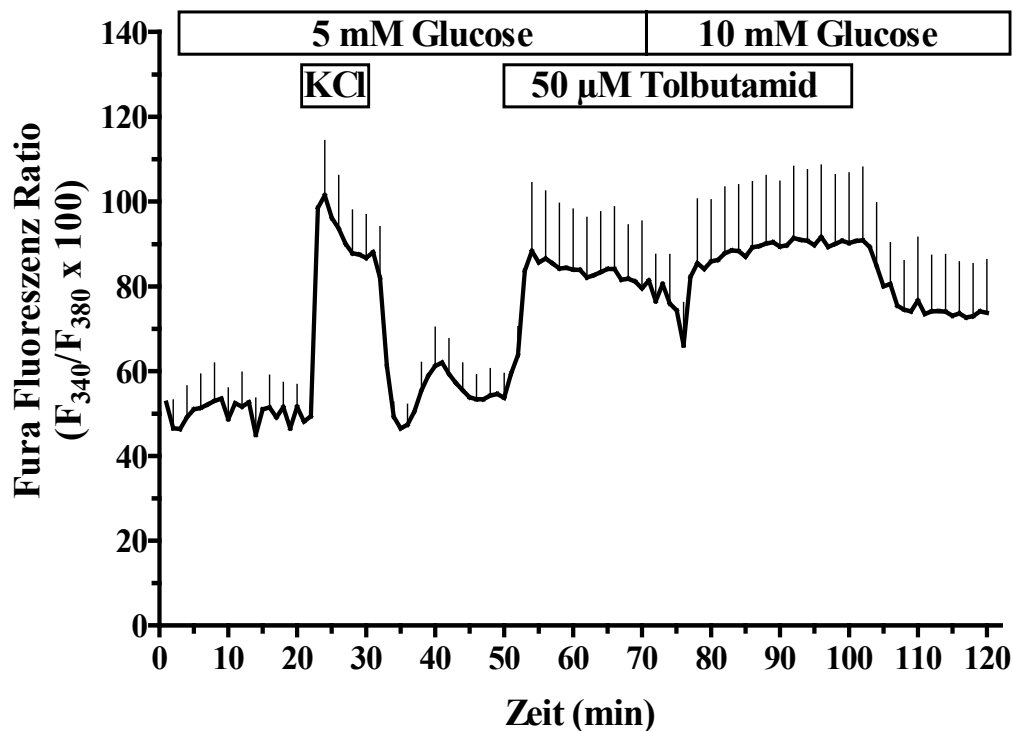


Abb. 4.32.: Calciumerhöhende Wirkung des Tolbutamids in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-70). Nach Depolarisation mit 40 mM K⁺ für 10 Minuten (Minute 20 - 30) wurde die Insel mit 50 µM Tolbutamid umströmt (Minute 50-100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 50 µM Tolbutamid wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Mittelwert ± SEM (n=3). Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Obgleich ein Anstieg der [Ca²⁺]_i während einer Depolarisation mit 44,7 mM Kaliumchlorid beobachtet werden konnte, wobei die [Ca²⁺]_i nach dem Aussetzen des depolarisierenden Effektes zunächst auf den Ausgangswert absank, wies die kurz darauf zu registrierende spontan reversible Erhöhung der [Ca²⁺]_i darauf hin, dass die funktionelle Integrität der Pankreasinseln in dieser Versuchsreihe etwas beeinträchtigt war, da eine solche Erhöhung nach einer Depolarisation in anderen Experimenten nicht zu beobachten war. In Gegenwart

Ergebnisse

von 5 mM Glucose stieg die Fura-Fluoreszenz-Ratio durch 50 μ M Tolbutamid innerhalb von vier Minuten von Ratio-Werten um 55 auf Ratio-Werte um 88 an. Es bildete sich dann ein steady state mit Ratio-Werten um 82 aus. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM - bei fortdauernder Anwesenheit von 50 μ M Tolbutamid - kam es nach einer Latenz von drei Minuten zu einer kurzfristigen Absenkung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auf die Hälfte des Plateauwertes, wobei eine zügige Wiederherstellung des Ausgangswertes registriert werden konnte. In Gegenwart von 10 mM Glucose und 50 μ M Tolbutamid konnte schliesslich ein höheres steady state (Ratio 90) erreicht werden als in Gegenwart von 5 mM Glucose. Während der Exposition mit Tolbutamid konnte in den Einzelexperimenten kein oszillatorisches Muster registriert werden (Grafik nicht dargestellt) und nach Beendigung der Exposition mit 50 μ M Tolbutamid konnte lediglich eine partielle Reversibilität innerhalb von 10 Minuten beobachtet werden. Beide Phänomene könnten zurückzuführen sein auf eine beeinträchtigte funktionelle Integrität der Pankreasinseln.

500 μ M Tolbutamid induzierten den in Abbildung 4.33. dargestellten Effekt auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus. Die Exposition mit 500 μ M Tolbutamid führte in Gegenwart von 5 mM Glucose zu einem schnellen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Ratio-Werten um 38 auf Ratio-Werte um 58 (Abb. 4.33.A.). Dieser Anstieg war etwas höher als derjenige verursacht durch eine K^+ -Depolarisation, der allerdings selbst gering ausfiel. Wie im Einzelexperiment dargestellt (Abb. 4.33.B.) kam es nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM - bei fortdauernder Anwesenheit von 500 μ M Tolbutamid - nach ca. drei Minuten zu einer kurzfristigen Absenkung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Absenkung ging dabei nahezu bis auf die Grundlinie zurück, wobei schon nach zwei Minuten wieder die Ausgangswerte erreicht wurden. Es entwickelten sich zudem in Anwesenheit von 500 μ M Tolbutamid keine cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen, es konnte vielmehr ein langanhaltender Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol registriert werden. Von Bedeutung war des weiteren die mangelnde Reversibilität, insbesondere deshalb, weil Tolbutamid bekanntermassen schnell und vollständig ausgewaschen wird.

In der darauf folgenden Abbildung 4.34. ist belegt, dass der durch 500 μ M Tolbutamid induzierte Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von 1 mM Glutamin und 1 mM KIC geringer ausfiel als in Gegenwart von 5 mM Glucose (vergl. Abb. 4.33).

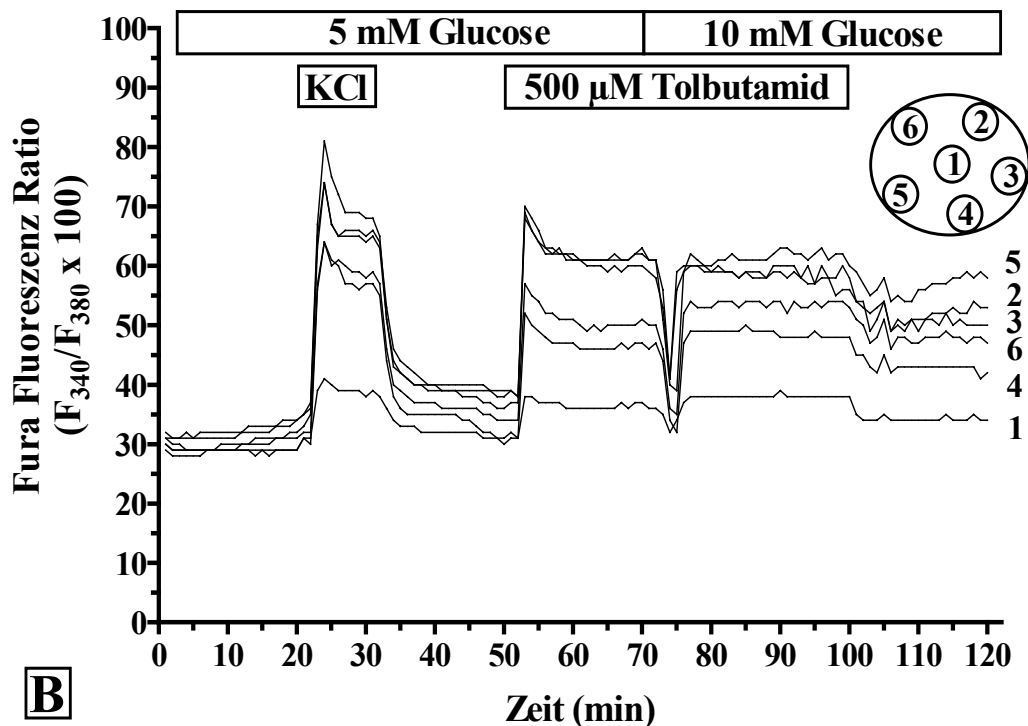
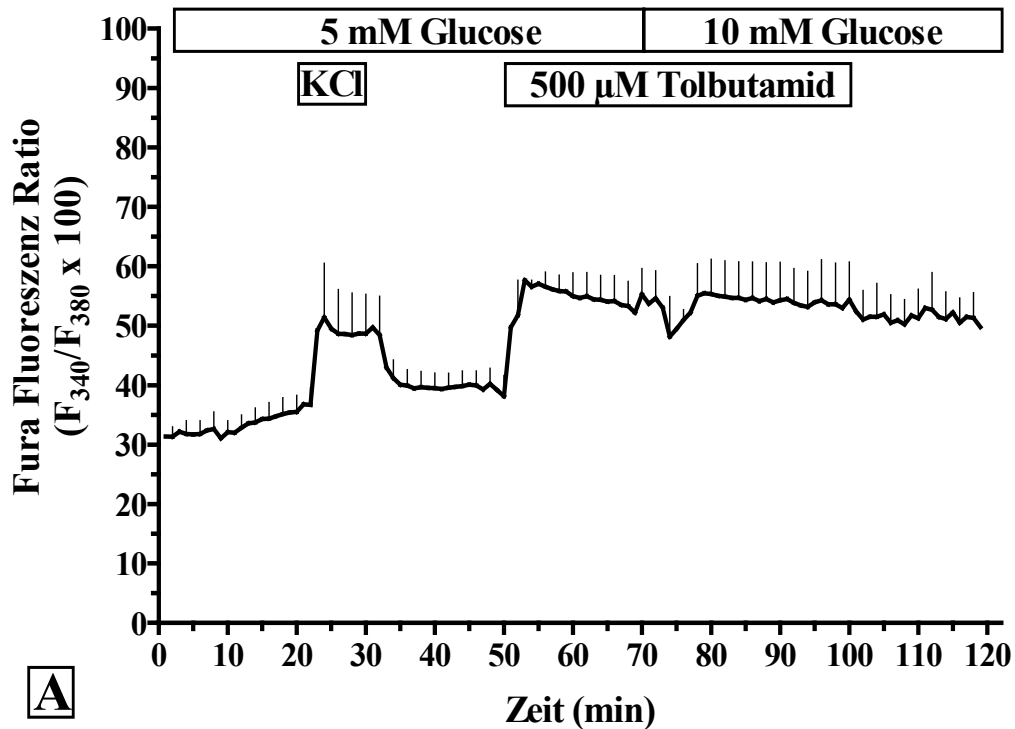


Abb. 4.33.: Calciumerhöhende Wirkung des Tolbutamids in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten (Minute 20-30) wurde mit 500 μ M Tolbutamid umströmt (Minute 50-100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 500 μ M Tolbutamid wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist ein Mittelwert \pm SEM aus 4 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die umströmten Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Ergebnisse

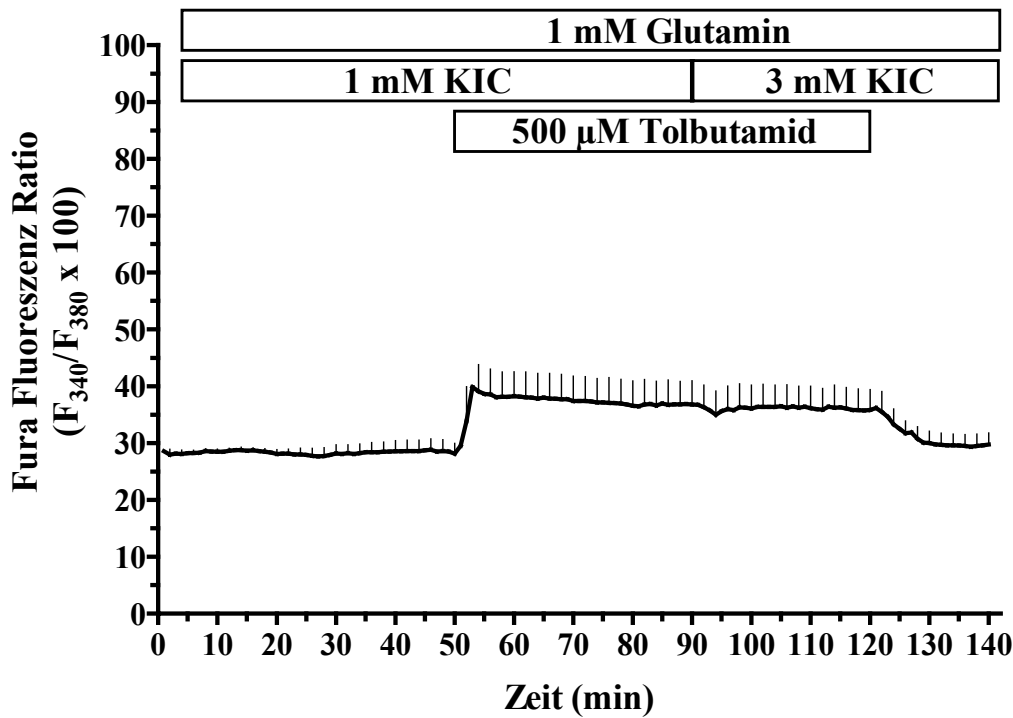


Abb. 4.34.: Der Tolbutamid-induzierten Ca^{2+} -Anstieg im Cytosol in Gegenwart von α -Ketoisocapronsäure (KIC). Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde während der gesamten Expositionsphase (Minute 0 bis 140) mit Krebs-Ringer-Medium, das 1 mM Glutamin enthielt, umströmt. Minute 0 bis 90 wurde dem Medium 1 mM KIC zugesetzt. Ab Minute 50 begann die Exposition mit 500 μM Tolbutamid (Minute 50 bis 120). Bei fortdauernder Anwesenheit von 500 μM Tolbutamid wurde in der Minute 90 die KIC-Konzentration auf 3 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Es ist ein Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten abgebildet. Die umströmten Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Es konnten zwei wesentliche Unterschiede in den beiden Kurvenprofilen der Umströmungen mit Tolbutamid in Gegenwart von Glucose (Abb. 4.33.) bzw. KIC (Abb. 4.34.) beobachtet werden: 1. Eine Absenkung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nach Erhöhung der KIC-Konzentration konnte nicht beobachtet werden, obgleich eine solche Erhöhung bei Steigerung der Glucosekonzentration registrierbar war. 2. Der durch 500 μM Tolbutamid induzierte Effekt war in Gegenwart von KIC innerhalb von 10 Minuten vollständig reversibel. In Gegenwart von Glucose war der Tolbutamid-induzierte Effekt hingegen nur partiell reversibel. Im Unterschied dazu war der wenig ausgeprägte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Gegenwart von 500 μM Tolbutamid und 1 mM KIC in Abbildung 4.34. vergleichbar mit demjenigen induziert durch 100 μM Efaroxan in Gegenwart von 1 mM KIC (Abb. 4.25.). Allerdings führte die Erhöhung der KIC-Konzentration von 1 mM auf 3 mM in Gegenwart von 500 μM Tolbutamid nicht zu einem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wie bei 100 μM Efaroxan (Abb. 4.25.). Wie in der folgenden Abbildung 4.35. dargestellt wurde auch die Änderung der cytosolischen

Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus verursacht durch hohe K^{+} -Konzentrationen in Gegenwart basaler (5 mM) und stimulatorischer (10 mM) Glucose untersucht.

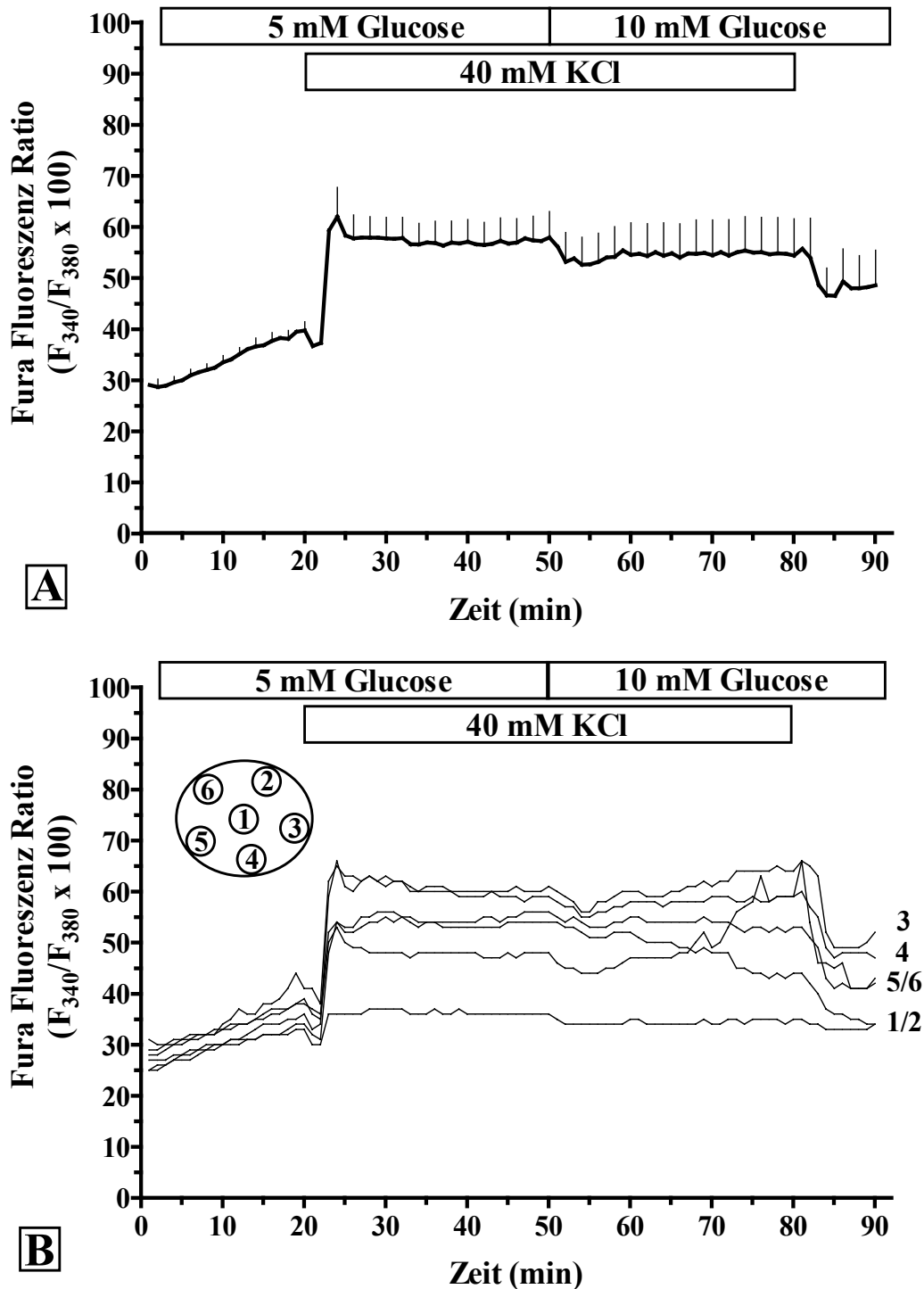


Abb. 4.35.: Calciuserhöhende Wirkung einer hohen K^{+} -Konzentration in Gegenwart von Glucose. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 50). Die Depolarisation mit 40 mM K^{+} erfolgte 60 Minuten lang (Minute 20 bis 80). Bei fortdauernder Anwesenheit der hohen K^{+} -Konzentration wurde in der Minute 50 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert \pm SEM aus 5 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Wie im Kurvenprofil des Mittelwertes dargestellt (Abb. 4.35.A.) stieg die $[Ca^{2+}]_i$ von Ratio-Werten um 35 auf Ratio-Werte um 63 an. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM - bei fortdauernder Anwesenheit von 44,7 mM Kaliumchlorid - konnte eine leichte Absenkung der $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden, bevor die $[Ca^{2+}]_i$ wieder leicht anstieg. Wie auch im Kurvenprofil des Einzel-experiments dargestellt (Abb. 4.35.B.) blieb eine kurzfristige Absenkung der $[Ca^{2+}]_i$ nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM in der Pankreasinsel aus. Gegen Ende der Umströmung konnte K^+ innerhalb von drei Minuten ausgewaschen werden, die Differenz zwischen den Ratio-Werten direkt vor der Exposition mit K^+ und denjenigen in der Auswaschphase ist durch den Effekt von 10 mM Glucose bedingt.

4.2.2.7 Interaktionen von Efaroxan mit Tolbutamid und 40 mM Kaliumchlorid bezüglich des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals in isolierten Pankreasinseln

In der Abbildung 4.36. ist das Kurvenprofil eines Einzel-experiments dargestellt, durch das der direkte Vergleich des Efaroxan-induzierten Effekts mit dem durch 50 μ M Tolbutamid induzierten Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus dokumentiert werden konnte.

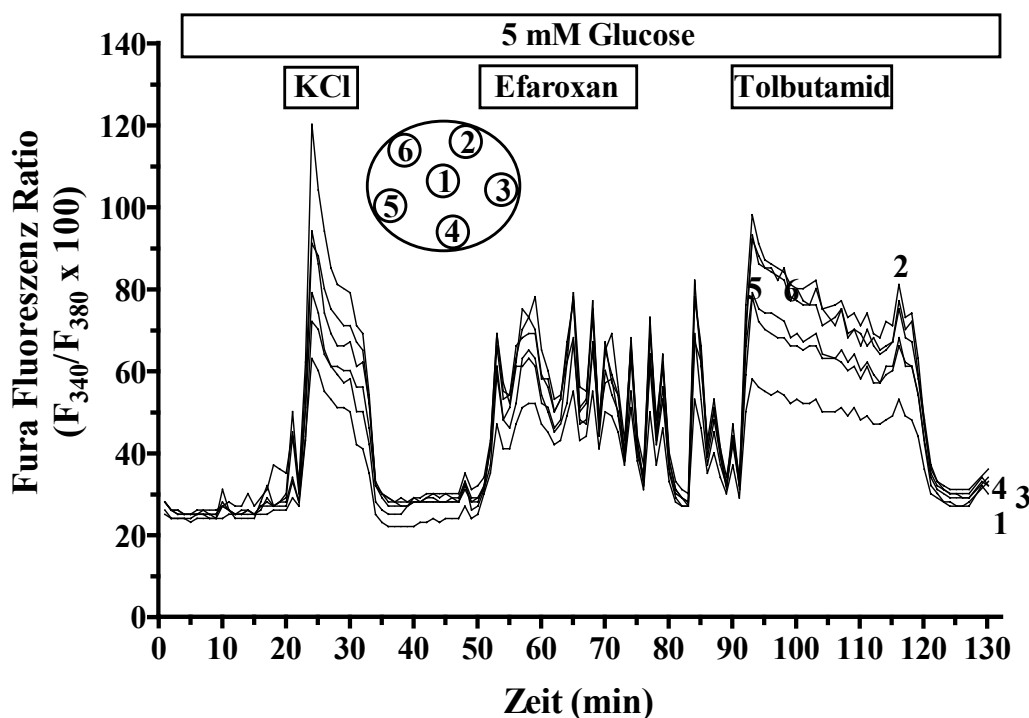


Abb. 4.36.: Direkter Vergleich des calciumerhöhenden Effekts induziert durch 100 μ M Efaroxan und 50 μ M Tolbutamid. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-130). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten (Minute 20-30) wurde die Insel mit 100 μ M Efaroxan umströmt (Minute 50-75), dann mit 50 μ M Tolbutamid (Minute 90-115). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzel-experiment, das repräsentativ ist für 3 weitere Experimente.

Ergebnisse

Es konnten die für Efaroxan charakteristischen synchronen und niederfrequenten ($x_{(n=4)}=0,18/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen induziert werden. Die Basalwerte der Amplituden dieser Oszillationen waren dabei allerdings erhöht. In der Auswaschphase konnten diese Oszillationen auch noch registriert werden, dabei wurden deren Amplituden aufgrund niedriger Basalwerte grösser. In Gegenwart von 50 μM Tolbutamid und 5 mM Glucose konnte dann an derselben Pankreasinsel ein mit schneller Kinetik eintretender langanhaltender Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ohne oszillatorisches Muster dokumentiert werden. In der Auswaschphase war dieser Tolbutamid-induzierte Effekt aber nach kurzen drei Minuten vollständig reversibel.

Dann wurde die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in der Pankreasinsel induziert durch 100 μM Efaroxan und danach durch 10 μM Tolbutamid in Gegenwart von 5 mM Glucose untersucht, da 10 μM Tolbutamid nicht stimulatorisch wirkt. Wie in der folgenden Abbildung 4.37.A. dargestellt initiierte die Exposition mit 100 μM Efaroxan nach einer Latenz von 5 Minuten einen Anstieg der Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte von 35 auf 52. Die durch eine depolarisierend wirkende K^+ -Konzentration (44,7 mM) hervorgerufene Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lag bei Ratio-Werten um 60. Wie im Kurvenprofil des Einzel-experimentes belegt (Abb. 4.37.B.) entwickelten sich durch 100 μM Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose erneut die charakteristischen Efaroxan-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen, wenngleich die Amplituden dieser Oszillationen zu Beginn der Expositionsphase hohe Basalwerte ausbildeten. Es entwickelten sich dann auch weitgehend synchrone und niederfrequente ($x_{(n=5)}=0,20/\text{min}$) Oszillationen, die in der Auswaschphase aufgrund der tieferen Basalwerte grössere Amplituden aufweisen konnten. Dabei unterschieden sich die Niveaus der einzelnen ROI's mit Ausnahme von ROI 1 nicht wesentlich voneinander. Der durch 10 μM Tolbutamid induzierte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war von schneller Kinetik und erreichte Fluoreszenz-Ratio-Werte von 40 auf 53 (Abb. 4.37.A.). Es entwickelte sich ein langanhaltender Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration ohne oszillatorisches Muster, erst kurz vor Beendigung der Expositionsphase konnte ein oszillatorisches Muster registriert werden. In der Auswaschphase konnte nur eine partielle Reversibilität des Tolbutamid-Effektes beobachtet werden. Der gleiche Efaroxan-Effekt konnte auch beobachtet werden, nachdem die Pankreasinsel einer Expositionsphase mit 10 μM Tolbutamid (Minute 50 bis 80) ausgesetzt worden war (Grafik nicht dargestellt).

Ergebnisse

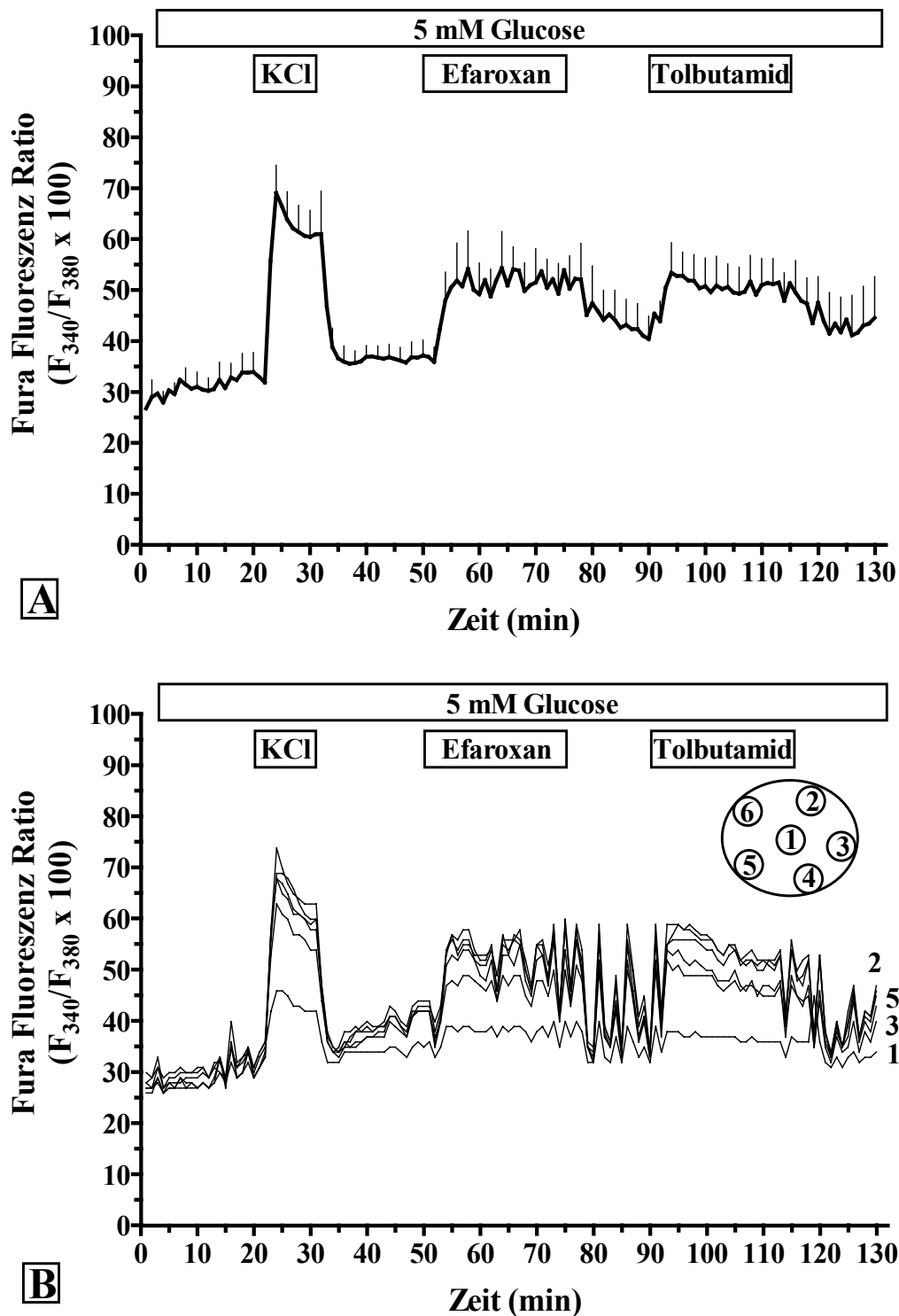


Abb. 4.37.: Direkter Vergleich des calciumerhöhenden Effekts von 100 μ M Efaroxan mit demjenigen von 10 μ M Tolbutamid (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde während der gesamten Expositionsphase mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 130). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten (Minute 20 bis 30) wurde die Insel mit 100 μ M Efaroxan umströmt (Minute 50 bis 75), dann mit 10 μ M Tolbutamid (Minute 90 bis 115). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist ein Mittelwert \pm SEM aus 5 Einzelexperimenten, in (B) ein Einzelexperiment abgebildet. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Es wurde dann untersucht, wie sich die Charakteristika des Efaroxan-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs durch gleichzeitige Anwesenheit von Tolbutamid (Abb. 4.38.) oder 40 mM Kaliumchlorid (Abb. 4.39.) ändern.

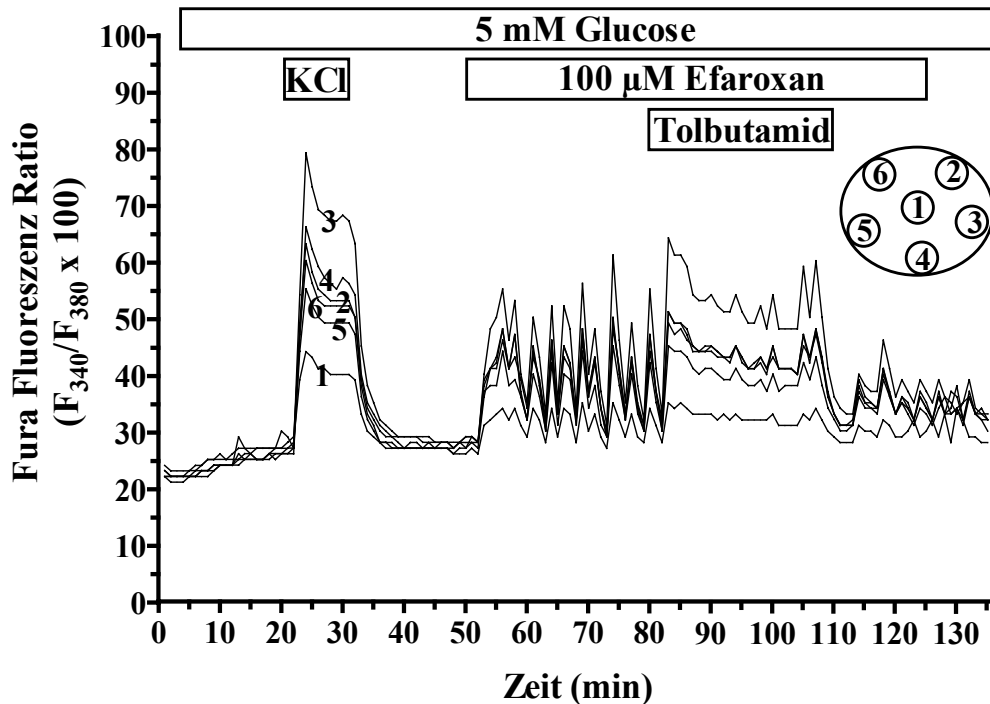


Abb. 4.38.: Modifizierung des Efaroxan-induzierten Effekts durch gleichzeitige Exposition mit 10 μ M Tolbutamid (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-135). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten (Minute 20-30) wurde die Insel mit 100 μ M Efaroxan umströmt (Minute 50-125). Ab Minute 80 wurde diesem Medium 10 μ M Tolbutamid zugesetzt (Minute 80-110). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, repräsentativ für 5 weitere Experimente.

In Abbildung 4.38. ist belegt, dass die $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von 100 μ M Efaroxan und 5 mM Glucose anstieg, und zwar von Ratio-Werten um 25 auf Ratio-Werte um 50. Es entwickelten sich dann regelmässig auftretende, synchrone und niederfrequente ($x_{(n=6)}=0,19/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen, deren Spitzenwerte Ratio-Werte von 61 erreichten. Die Minima der zu Beginn dieser Expositionsphase beobachtbaren Oszillationen erreichten nicht den Ausgangswert, später lagen fast alle Minima der Amplituden der Oszillationen der ROI's der Pankreasinsel auf dem Niveau des Ausgangswertes. Der charakteristische Efaroxan-induzierte Effekt konnte durch 10 μ M Tolbutamid beeinflusst werden: Es entwickelte sich eine plateauförmige Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ohne oszillatorisches Muster. Dabei lag das Plateau höher als bei 10 μ M Tolbutamid alleine (Abb. 4.37.). In der Auswaschphase von 10 μ M Tolbutamid konnten nur persistierende Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet werden, obgleich in dieser Expositionsphase noch 100 μ M Efaroxan anwesend war.

Ergebnisse

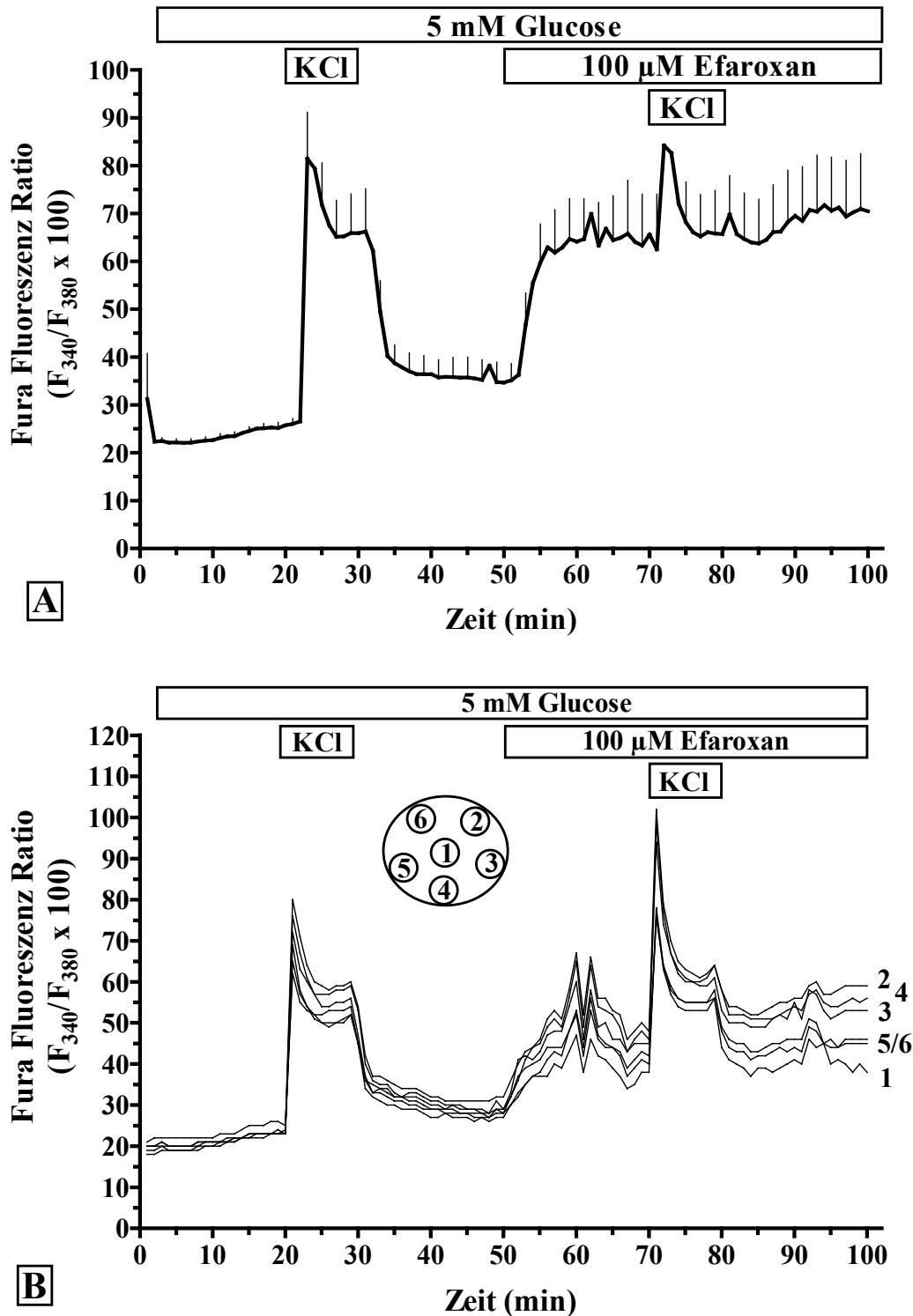


Abb. 4.39.: Modifizierung des Efaroxan-induzierten Effekts durch gleichzeitige Exposition mit 44,7 mM Kaliumchlorid (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 100). Nach Depolarisation mit 40 mM K⁺ für 10 Minuten (Minute 20 bis 30) wurde die Insel mit 100 μM Efaroxan umströmt (Minute 50 bis 100). Ab Minute 70 wurde diesem Medium für 10 Minute 40 mM Kaliumchlorid zugesetzt (Minute 80 bis 90). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Mittelwert ± SEM aus 4 Einzelexperimenten (A) und ein Einzelexperiment (B). Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Wie in Abbildung 4.39.A. belegt konnte durch die erste Einwirkung einer depolarisierend wirkenden K^+ -Konzentration ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration von Ratio-Werten um 25 auf Ratio-Werte um 65 (Plateau) erzielt werden. Nach der Absenkung der K^+ -Konzentration auf 4,7 mM wurden die zu Beginn der Umströmung sehr niedrigen Ausgangswerte nicht mehr erreicht, die Basislinie lag dann bei Ratio-Werten um 35. Auch im Einzelexperiment (Abb. 4.39.B.) konnte ein ähnlicher Kurvenverlauf beobachtet werden. Durch 100 μ M Efaroxan erhöhte sich die Fura-Fluoreszenz-Ratio nach einer Verzögerung von ca. vier Minuten schliesslich bis auf 65 (Plateau; Abb. 4.39.A.). Das durch Efaroxan induzierte steady state entsprach dabei dem steady state induziert durch die hohe K^+ -Konzentration zu Beginn der Perfusion. Im Einzelexperiment war zu beobachten, dass sich nach einer Latenz von fast 10 Minuten synchrone Ca^{2+} -Oszillationen entwickelten, deren Spitzenwerte bei Ratio-Werten um 65 lagen und deren Minima die Grundlinie nicht erreichten (Abb. 4.39.B.). Durch die darauf folgende Einwirkung von 44,7 mM Kaliumchlorid konnte im Einzelexperiment - bei fortdauernder Anwesenheit von Efaroxan - ein Ca^{2+} -Peak initiiert werden, der stärker ausgeprägt war als der Peak der ersten K^+ -Depolarisation. Im Mittelwert konnte ein Ca^{2+} -Peak initiiert werden mit einem Anstieg der Fura-Ratio um ca. 20. Dieser Peak entsprach dem Peak der ersten K^+ -Depolarisation. In der Auswaschphase von K^+ verminderte sich die Fura-Ratio sowohl im Einzelexperiment als auch im Mittelwert nicht, sie stieg - im Gegensatz zum Tolbutamid (Abb. 4.38.) - eher etwas an.

4.2.2.8 Das Imidazolin Efaroxan und sein Imidazol-Analogon KU14R: Dokumentation von KU14R-induzierten Effekten auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus im Vergleich mit Efaroxan

In dieser Versuchsreihe wurde der Effekt des Imidazol-Analogons KU14R auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der Langerhans'schen Insel untersucht und ein direkter Vergleich des KU14R-induzierten Effektes mit dem Efaroxan-induzierten Effekt erstellt. Es wurde zunächst die Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in der Pankreasinsel während der Perfusion mit einer KU14R-Konzentration von 100 μ M in Kombination mit einer basalen (5 mM) und einer stimulatorisch wirkenden (10 mM) Glucosekonzentration untersucht. Dazu wurde dasselbe experimentelle Protokoll eingesetzt, das auch zur Untersuchung des Efaroxan-induzierten Effektes verwendet wurde (s. Abb. 4.21.).

Ergebnisse

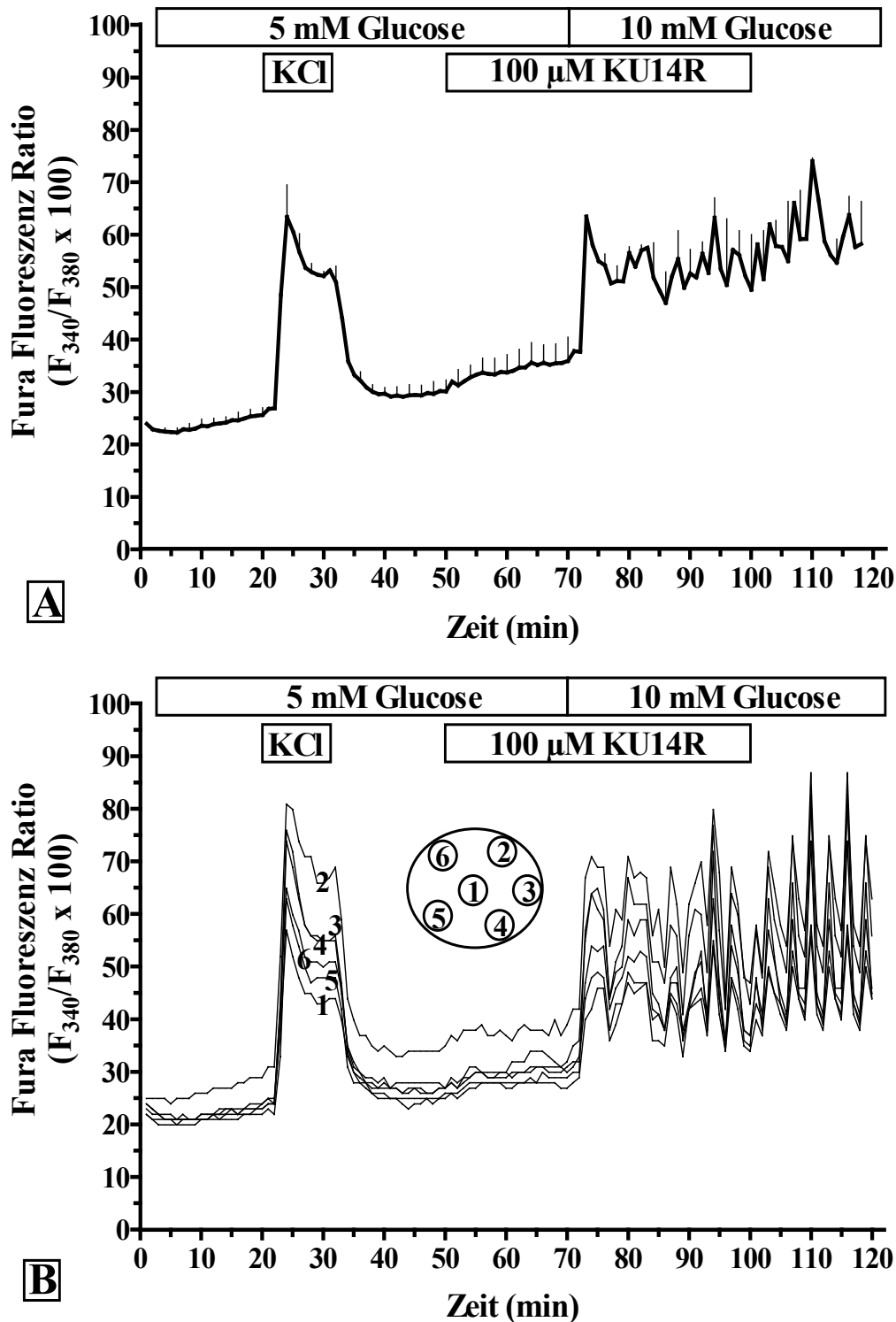


Abb. 4.40.: Minimale calciumerhöhende Wirkung von 100 µM KU14R in Gegenwart von Glucose (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K⁺ für 10 Minuten wurde die Insel mit 100 µM KU14R umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 µM KU14R wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In (A) ist der Mittelwert ± SEM aus 3 Einzelexperimenten abgebildet, in (B) ein Einzelexperiment. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Ergebnisse

Wie im Kurvenprofil des Mittelwertes dargestellt (Abb. 4.40.A.) induzierten 100 μM KU14R nur eine geringe Steigerung der Fura-Ratio von 30 auf 35. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM konnte ein schneller Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von Ratio-Werten um 35 auf Ratio-Werte um 62 registriert werden. In dieser Expositionsphase entwickelten sich auch synchrone und niederfrequente ($x_{(n=3)}=0,30/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen (Abb. 4.40.B.). Dabei erreichten die Minima der Amplituden der Oszillationen nicht mehr ganz den Basalwert, dahingegen lagen aber die Niveaus der verschiedenen ROI's nahe beieinander. Nach dem Aussetzen des KU14R-induzierten Effektes konnte keine Reversibilität beobachtet werden. Es konnten weiterhin synchrone, niederfrequente und regelmässige Ca^{2+} -Oszillationen in der Auswaschphase registriert werden, deren Maxima Ratio-Werte um 85 erreichten. Die Maxima dieser Amplituden waren wesentlich grösser als diejenigen, die durch 10 mM Glucose alleine induziert werden konnten (s. Kontrollexperiment Abb. 4.4.).

Dann wurde der Effekt von 300 μM KU14R auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration unter Verwendung desselben experimentellen Protokolls untersucht (Abb. 4.41), da sich gezeigt hatte, dass mit 300 μM KU14R ein vollständiger K_{ATP} -Kanalschluss zu erwarten war.

Wie im Kurvenverlauf des Mittelwertes dargestellt (Abb. 4.41.A.) stiegen die Fura-Fluoreszenz-Ratio-Werte während der Exposition mit 300 μM KU14R in Gegenwart von 5 mM Glucose nur von 28 auf 35 an. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM konnte ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ von 35 auf maximale Ratio-Werte um 45 registriert werden. Auffallend war, dass das Ausmass des internen Standards auch nur wenig ausgeprägt war. Im Einzelexperiment (Abb. 4.41.B) konnten in dieser Expositionsphase synchrone und niederfrequente ($x_{(n=3)}=0,29/\text{min}$) Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet werden (Abb. 4.41.B.), deren Amplitudengrössen wesentlich geringer ausgeprägt waren als in Gegenwart von 100 μM KU14R (vergl. Abb. 4.40.). Nach dem Aussetzen war auch der durch 300 μM KU14R-induzierte Effekt nicht reversibel, die Oszillationen blieben erhalten.

Ergebnisse

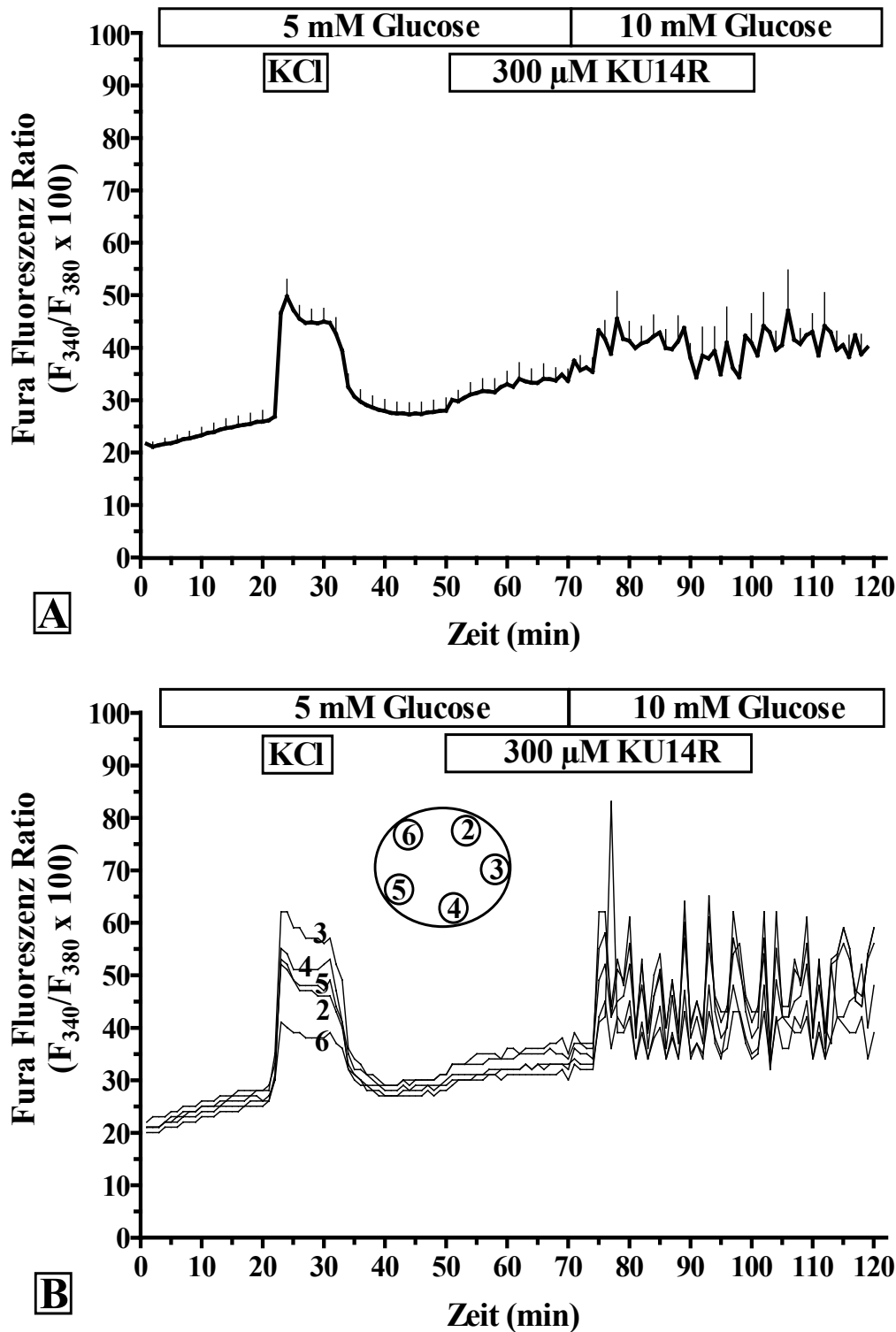


Abb. 4.41.: Geringfügige calciumerhöhende Wirkung von 300 μ M KU14R in Gegenwart von Glucose (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 70). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten wurde die Insel mit 300 μ M KU14R umströmt (Minute 50 bis 100). Bei fortdauernder Anwesenheit von 300 μ M KU14R wurde in der Minute 70 die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. In **(A)** ist der Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten abgebildet, in **(B)** ein Einzelexperiment. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

In Gegenwart basaler Glucosekonzentration (5 mM) wurden dann die Effekte von 100 μM Efaroxan und 300 μM KU14R auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Pankreasinseln der Maus direkt verglichen (Abb. 4.42.): Zu Beginn der Perifusion konnten sehr geringe Ratio-Werte von 23 registriert werden. Die Depolarisation mit einer hohen K^+ -Konzentration induzierte eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Ratio-Werte um 50 (Plateau). Nach Absenkung der K^+ -Konzentration auf 4,7 mM sank die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Ratio-Werte um 20 ab. Der durch 100 μM Efaroxan induzierte Effekt war gering ausgeprägt, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöhte sich nur von Ratio-Werten um 20 auf Ratio-Werte um durchschnittlich 38. Die Exposition mit 300 μM KU14R führte zu einem noch weniger stark ausgeprägten Anstieg: Ausgehend von einem in der Auswaschphase von Efaroxan registrierbaren Ratio-Wert von 22 konnte ein Anstieg der Fura-Ratio auf maximal 34 beobachtet werden. In der Auswaschphase war der KU14R-induzierte Effekt vollständig reversibel. Auch der umgekehrte Fall, d.h. eine mit 300 μM KU14R beginnende Perifusion und eine darauf folgende Perifusion mit 100 μM Efaroxan, wurde untersucht (Grafik nicht dargestellt). Auch unter den Bedingungen war der Effekt von KU14R geringer als derjenige von Efaroxan.

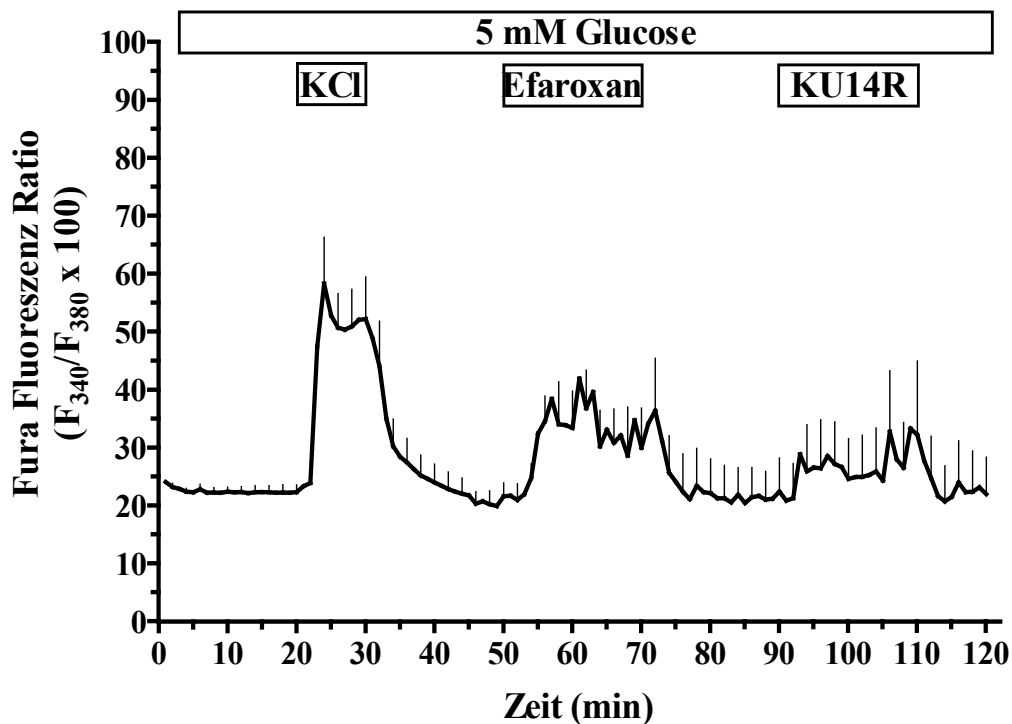


Abb. 4.42.: Direkter Vergleich des calciumerhöhenden Effekts induziert durch 100 μM Efaroxan und 300 μM KU14R (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 5 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-120). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ für 10 Minuten (Minute 20-30) wurde mit 100 μM Efaroxan umströmt (Minute 50-70), dann mit 300 μM KU14R (Minute 90-110). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein aus 5 Einzelexperimenten ermittelter Mittelwert \pm SEM, der durch Subtraktion einer Basislinie (0,2) modifiziert wurde. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Es stellte sich dann die Frage, ob der Efaroxan-induzierte Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Pankreasinseln durch 300 μM KU14R antagonisiert werden konnte.

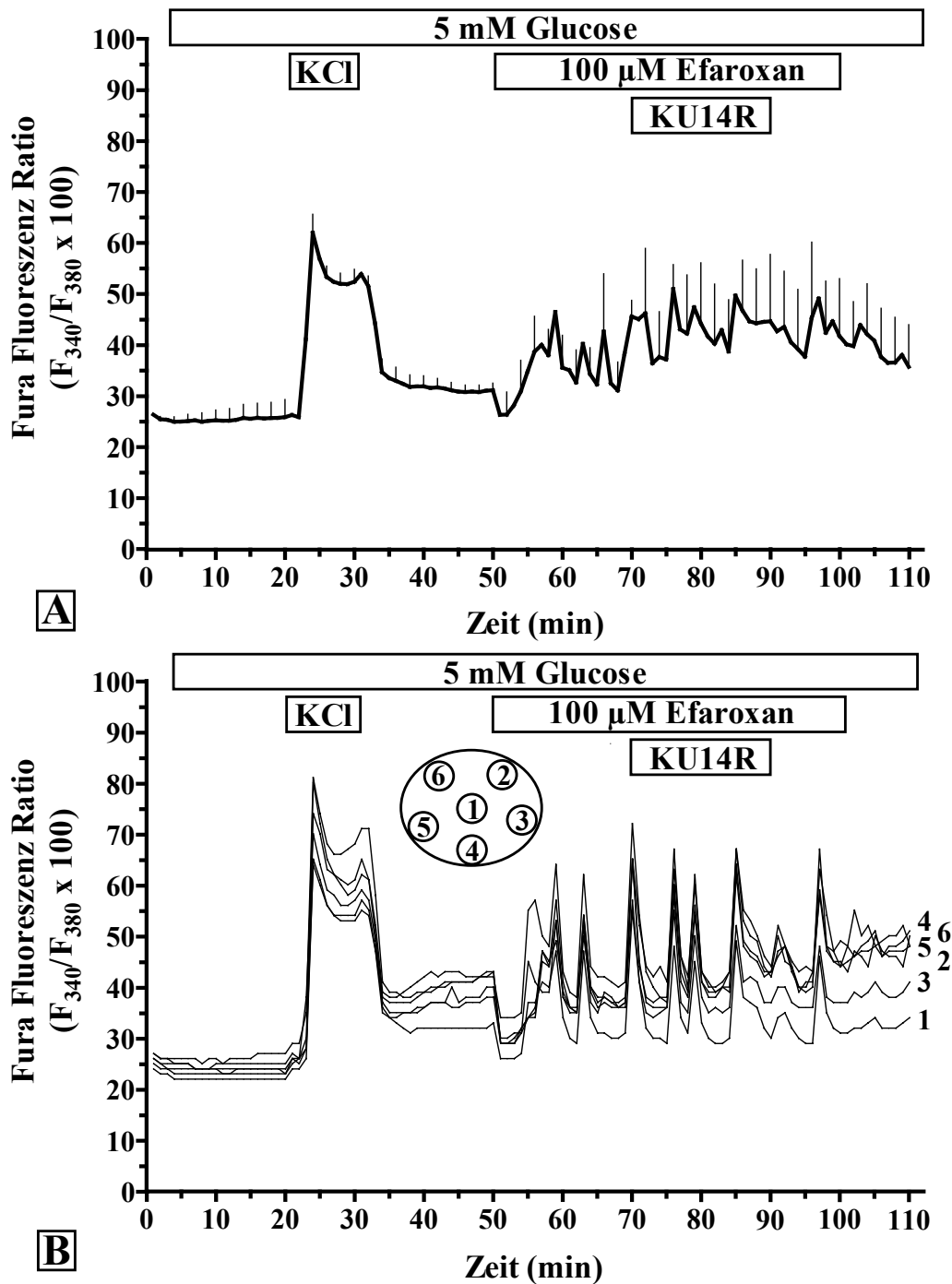


Abb. 4.43.: Fehlender antagonisierender Effekt von 300 μM KU14R auf die Efaroxan-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Präparationsmethode nach Gotoh et al., 1985). Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium (mit 5 mM Glucose) umströmt (Minute 0-110). Nach Depolarisation mit 40 mM K^+ (Minute 20-30) wurde die Insel mit 100 μM Efaroxan umströmt (Minute 50-100). Ab Minute 70 wurde diesem Medium 300 μM KU14R zugesetzt (Minute 70-90). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit (min) dargestellt. In (A) ist ein Mittelwert \pm SEM ($n=4$) abgebildet, der durch Subtraktion einer Basislinie (0,2) modifiziert wurde, in (B) ein Einzelexperiment. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Der calciumsteigernde Effekt von 100 μM Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose konnte sowohl im Kurvenverlauf des Einzelexperiments (Abb. 4.43.B.) - in dem synchrone und niederfrequente ($x_{(n=4)}=0,20/\text{min}$) Oszillationen registriert werden konnten - als auch im Kurvenprofil des Mittelwertes belegt werden: in Abbildung 4.43.A. ist dargestellt, dass die Fura-Fluoreszenz-Ratio in Gegenwart von 5 mM Glucose durch 100 μM Efaroxan von Ratio-Werten um 32 auf maximale Ratio-Werte von 48 anstieg. Auffallend ist dabei, dass zu Beginn der Exposition mit Efaroxan eine kurzfristige, aber deutliche Abnahme der Ratio-Werte registrierbar war. Durch die zusätzliche Exposition mit 300 μM KU14R konnten weder im Kurvenverlauf des Einzelexperiments noch im Kurvenprofil des Mittelwertes wesentliche Änderungen in der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol der Pankreasinseln registriert werden. Bemerkenswerterweise konnte auch das charakteristische Efaroxan-induzierte oszillatorische Muster durch 300 μM KU14R nicht antagonisiert werden. Es konnten ununterbrochen synchrone und niederfrequente Oszillationen ($x_{(n=4)}=0,26/\text{min}$) beobachtet werden. Allerdings konnte, wie im Kurvenprofil des Einzelexperiments ersichtlich, im Laufe der Perfusion ein progressiver Anstieg der Ratio-Werte in den ROI's 4, 5 und 6 beobachtet werden, während ROI 1 konstant verlief.

Um zu überprüfen, ob KU14R oder Efaroxan den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle hemmen können, wurde die Pankreasinsel mit einem Krebs-Ringer-Medium umströmt, das neben 5 mM Glucose auch 44,7 mM Kaliumchlorid und die entsprechende Testsubstanz enthielt. Wie in Abbildung 4.44. dargestellt, induzierte die K^+ -Depolarisation einen Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol, der erwartungsgemäss etwas geringer ausfiel als in Gegenwart von 10 mM Glucose (vergl. Abb. 4.2.). Es konnte ein Anstieg der Ratio-Werte von 39 auf 68 (Plateau) ermittelt werden. Während der zusätzlichen Exposition mit 300 μM KU14R nahm die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dann kontinuierlich bis auf Ratio-Werte um 58 ab und nach Aussetzen der KU14R-induzierten Wirkung konnte ein Wiederanstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf Ratio-Werte um 68 registriert werden. In der Auswaschphase konnte schliesslich nur eine unvollständig Reversibilität registriert werden, obwohl in dieser Phase nur eine substimulatorische Glucosekonzentration (5 mM) anwesend war.

Der in Abbildung 4.45. dargestellte Ca^{2+} -Peak induziert durch eine depolarisierend wirkende K^+ -Konzentration reichte von sehr geringen Ratio-Werten um 30 auf einen extrem hohen Ratio-Wert um 100. Die Ratio-Werte der plateauförmigen Erhöhung lagen bei 80. Diese durch eine K^+ -Depolarisation hervorgerufene Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nahm in Gegenwart von 100 μM Efaroxan nicht ab (Ratio 81).

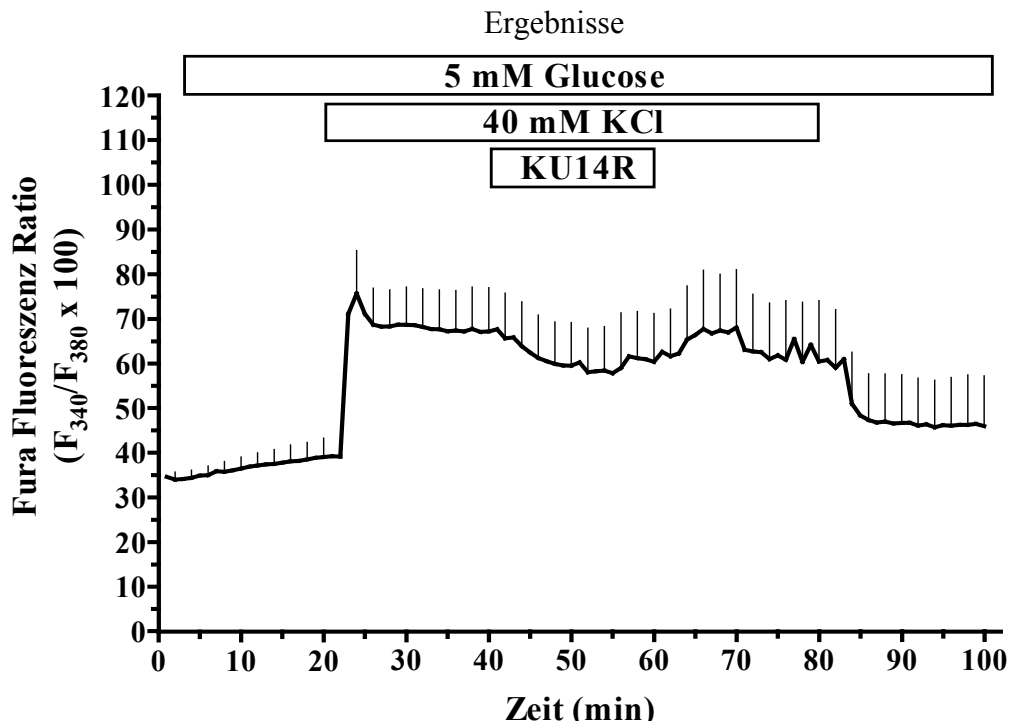


Abb. 4.44.: Der KU14R-induzierte Effekt in Gegenwart einer hohen K^+ -Konzentration. Die kultivierte, mit Fura-PE3 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium (mit 5 mM Glucose) umströmt (Minute 0-100). Ab Minute 20 erfolgte eine Depolarisation mit 40 mM K^+ für 60 Minuten (Minute 20-80). Ab Minute 40 wurde diesem Medium für 20 Minuten 300 μ M KU14R zugesetzt (Minute 40-60). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit (min) dargestellt. Abgebildet ist ein Mittelwert \pm SEM aus 6 Einzelexperimenten. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen (nach Gotoh) gewonnen.

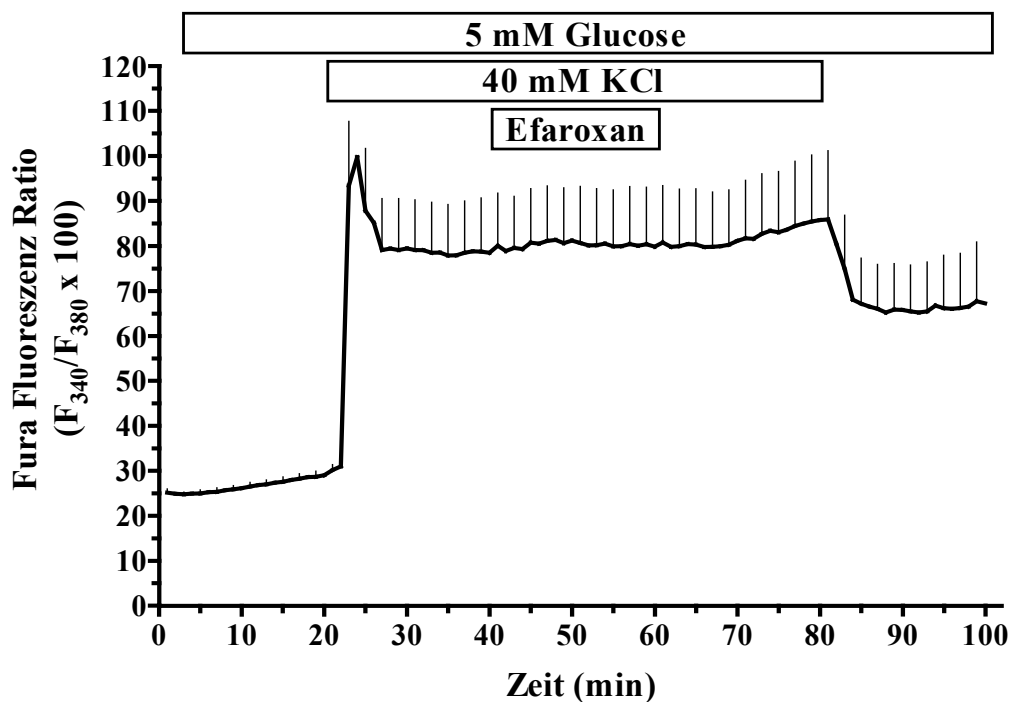


Abb. 4.45.: Der Efaroxan-induzierte Effekt in Gegenwart einer hohen K^+ -Konzentration. Die kultivierte, mit Fura-PE3 beladene Pankreasinsel (Maus) wurde mit KR-Medium (5 mM Glucose) umströmt (Minute 0-100). Ab Minute 20 erfolgte eine Depolarisation mit 40 mM K^+ für 60 Minuten (Minute 20-80). Ab Minute 40 wurde diesem Medium für 20 Minuten 100 μ M Efaroxan zugesetzt (Minute 40-60). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit (min) dargestellt. Abgebildet ist ein Mittelwert \pm SEM aus 6 Einzelexperimenten. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen (nach Gotoh) gewonnen.

In der Auswaschphase konnte wieder nur eine unvollständige Reversibilität in Gegenwart von 5 mM Glucose beobachtet werden. Da die in Abbildung 4.44. und 4.45. beschriebenen Umströmungen ungefähr zur gleichen Zeit durchgeführt wurden, könnte das Phänomen des „leakage“ (vergl. Abb. 4.11. und 4.12.) hier die Ursache für eine kontinuierliche Erhöhung der Basislinie und damit für die nur partielle Reversibilität in der Auswaschphase in Gegenwart von 5 mM Glucose sein.

Wie bereits in Abbildung 4.11. und 4.12. (s. Kapitel 4.1.1) dargestellt wurde auch die Wirkung von 300 μ M KU14R und 100 μ M Efaroxan auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus bei gleichzeitiger Exposition mit dem Hemmstoff Thapsigargin (1 μ M) in Gegenwart basaler Glucose (5 mM) untersucht, wobei durch Thapsigargin kein nennenswerter Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol beobachtet werden konnte und der Effekt von 300 μ M KU14R unverändert gering ausfiel.

4.2.3 Modifizierung der NAD(P)H-Konzentration in Pankreasinseln der Maus durch das Imidazolin Efaroxan

Bevor die durch Efaroxan induzierte Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln der Maus bestimmt werden konnte, wurden einige Kontrollexperimente durchgeführt, die in den folgenden Kapiteln aufgeführt sind.

4.2.3.1 Detektion von NAD(P)H-Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe des 1 λ -Epifluoreszenzmikroskops

Wie im Kurvenverlauf des Einzelexperiments dargestellt (Abb. 4.46.) stieg die Signalintensität bei Erhöhung der NAD(P)H-Konzentration von 0 mM auf 1 mM und von 1 mM auf 5 mM um 50 % an. Bei Verdoppelung der NAD(P)H-Konzentration von 5 mM auf 10 mM konnte wieder nur ein Anstieg der Signalintensität um etwas mehr als 50 % registriert werden, bei Verdoppelung von 10 mM NAD(P)H auf 20 mM NAD(P)H konnte ein Anstieg der Signalintensität um fast 100 % beobachtet werden. Kritisch zu beurteilen ist aber die Abnahme der Fluoreszenzintensität während der Umströmungsphasen mit 5 mM, 10 mM und 20 mM NAD(P)H, da in diesem Experiment keine Pankreasinsel verwendet wurde und so das Phänomen des „Ausbleichens“ der Pankreasinsel („Fading“) nicht die Ursache dieser Intensitätsabnahme sein kann. Trotzdem belegt dieses Kontrollexperiment, das sich mit Hilfe des 1 λ -Epifluoreszenzmikroskops NAD(P)H-Fluoreszenzintensitäten detektieren lassen.

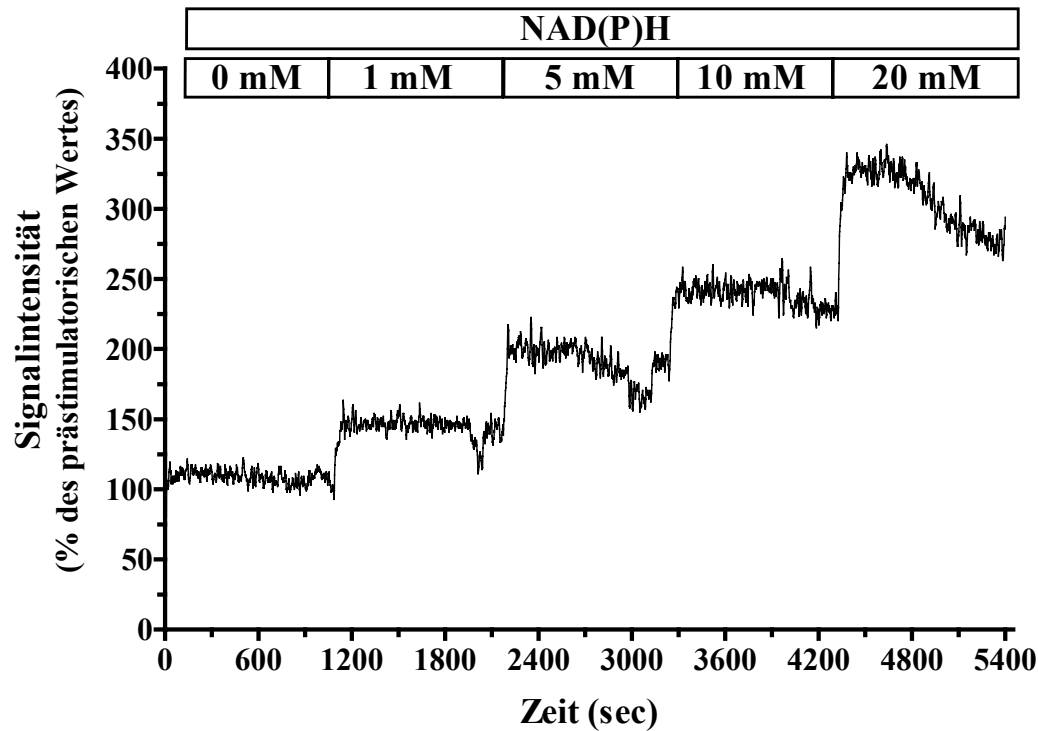


Abb. 4.46.: Messung von NAD(P)H-Fluoreszenzintensitäten. Zur Durchführung dieses Kontrollexperiments wurde keine Pankreasinsel benötigt. Über einen Zeitraum von 5400 sec (90 Minuten) wurden unterschiedliche Konzentrationen einer NAD(P)H-Lösung durch eine Perifusionskammer geleitet, um zu überprüfen, ob die Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität mit Hilfe des verwendeten 1λ -Epifluoreszenzmikroskops registrierbar war. Es wurden folgende NAD(P)H-Konzentrationen eingesetzt: 0 mM NAD(P)H (Sekunde 0 bis 1000), 1 mM NAD(P)H (Sekunde 1000 bis 2100), 5 mM NAD(P)H (Sekunde 2100 bis 3200), 10 mM NAD(P)H (Sekunde 3200 bis 4200) und 20 mM NAD(P)H (Sekunde 4200 bis 5400). Dargestellt ist die Signalintensität in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf 5 mM NAD(P)H (Sekunde 1000) wurde auf 100 % gesetzt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für ein weiteres Experiment.

4.2.3.2 Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Gegenwart unterschiedlicher Glucosekonzentrationen bei Raumtemperatur in Pankreasinseln der Maus

Die folgenden experimentellen Befunde zur Untersuchung der Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in der Pankreasinsel der Maus durch 0 mM, 5 mM und 20 mM Glucose bei Raumtemperatur belegen die Abhängigkeit der Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität von der Stimulation des Energiestoffwechsels.

Wie im Kurvenverlauf des Mittelwertes in Abbildung 4.47. dargestellt, sank die Signalintensität bei Raumtemperatur in Abwesenheit von Glucose mit einer Geschwindigkeit von 1,8 E/min ab. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 5 mM stieg die Signalintensität innerhalb von 400 Sekunden um ca. 14 % an. Die Geschwindigkeit lag bei

2,1 E/min. Es bildete sich dann eine Plateauphase aus. Nach erneuter Absenkung der Glucosekonzentration auf 0 mM nahm die Signalintensität mit hoher Geschwindigkeit von 6 E/min ab. Während dieser Umströmung konnte eine kontinuierliche Fluoreszenzabnahme vor und nach der Exposition mit Glucose beobachtet werden. Eine solche Abnahme konnte in fast allen Experimenten, die an diesem Leitz-Mikroskop durchgeführt worden sind, beobachtet werden und ist zurückzuführen auf ein „Ausbleichen“ der Pankreasinsel („Fading“) während der Umströmung, verursacht durch die technischen Messbedingungen (s. Methodenteil).

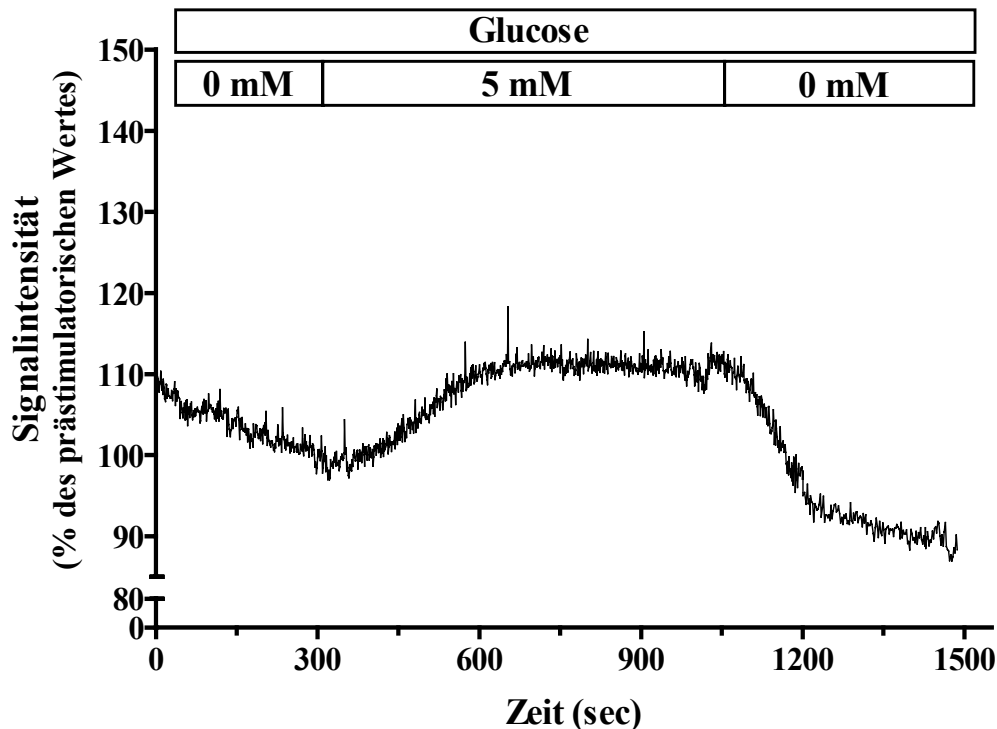


Abb. 4.47.: Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln der Maus durch Glucose bei Raumtemperatur. Die Insel wurde zunächst für 5 Minuten mit Krebs-Ringer-Medium perfundiert, das 0 mM Glucose enthielt (Sekunde 0 bis 300). Es folgte eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 5 mM (Sekunde 300 bis 1050) und ab Sekunde 1050 wieder eine Absenkung der Glucosekonzentration auf 0 mM. Dargestellt ist die Signalintensität in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Sekunden. Abgebildet ist ein laufender Mittelwert aus 5 Einzelerperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf eine höhere Glucosekonzentration (Sekunde 300) wurde auf 100 % gesetzt. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

In der folgenden Abbildung 4.48. ist zu beobachten, dass die Signalintensität in Abwesenheit von Glucose bei Raumtemperatur mit einer Geschwindigkeit von 2,0 E/min abnahm, um nach Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 20 mM nach einer Latenz von 100 sec mit einer Geschwindigkeit von 8,9 E/min um 37 % anzusteigen. Es bildete sich wieder eine Plateauphase aus und nach Absenkung der Glucosekonzentration auf 0 mM sank die Signalintensität nach einer Latenz von 100 sec mit einer Geschwindigkeit von 7,4 E/min wieder ab.

Ergebnisse

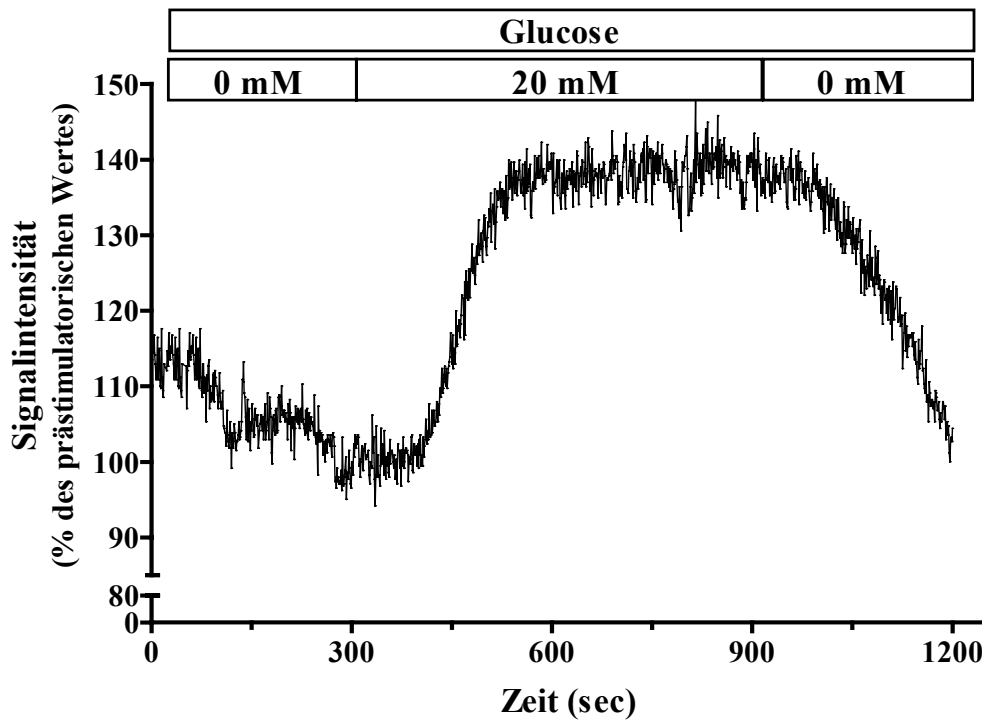


Abb. 4.48.: Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln der Maus durch Glucose bei Raumtemperatur. Die Insel wurde zunächst für 5 Minuten mit Krebs-Ringer-Medium perfundiert, das 0 mM Glucose enthielt (Sekunde 0 bis 300). Es folgte eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 20 mM (Sekunde 300 bis 900) und ab Sekunde 900 folgte dann wieder eine Absenkung der Glucosekonzentration auf 0 mM. Dargestellt ist die Signalintensität in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Sekunden. Abgebildet ist ein Einzelexperiment. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf eine höhere Glucosekonzentration (Sekunde 300) wurde auf 100 % gesetzt.

4.2.3.3 Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Langerhans'schen Inseln der Maus in Gegenwart von Glucose

Um den Effekt einer Temperaturerhöhung auf die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz in Pankreasinseln zu untersuchen, wurde die Langerhans'sche Insel wieder mit Krebs-Ringer-Medium, das 0 mM Glucose und 20 mM Glucose enthielt, umströmt. Die Perfusionen wurden dabei jedoch nicht bei Raumtemperatur, sondern bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

In Abwesenheit von Glucose nahm die Signalintensität bei einer Temperatur von ca. 36°C mit einer Geschwindigkeit von 1,8 E/min ab (Abb. 4.49.). Eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 20 mM hatte einen Anstieg der Signalintensität innerhalb von 400 Sekunden um 18 % zur Folge. Dieser Anstieg erfolgte ohne Latenz mit einer Geschwindigkeit von 2,7 E/min. Wie bereits in Kapitel 4.2.3.2 beschrieben stieg die Signalintensität bei Raumtemperatur und Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 20 mM mit einer wesentlich höheren Geschwindigkeit von 8,9 E/min an (s. Abb. 4.48.), d.h. die Zunahme der

Signalintensität war mehr als dreimal so schnell. Ein weiterer Unterschied war, dass vor dem schnellen Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität bei Raumtemperatur eine Latenzzeit zu beobachten war (s. Abb. 4.48.).

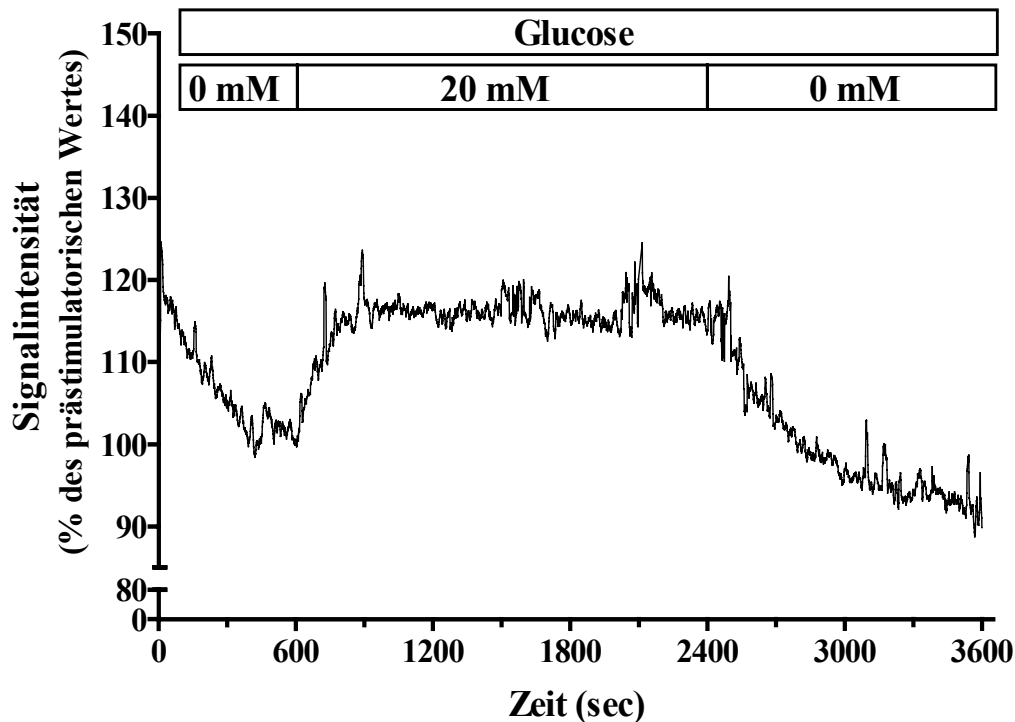


Abb. 4.49.: Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln der Maus durch Glucose bei 36°C. Die Insel wurde zunächst für 10 Minuten mit Krebs-Ringer-Medium perfundiert, das 0 mM Glucose enthielt (Sekunde 0 bis 600). Es folgte eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 20 mM (Sekunde 600 bis 2400) und ab Sekunde 2400 folgte dann wieder eine Absenkung der Glucosekonzentration auf 0 mM. Dargestellt ist die Signalintensität in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Sekunden. Abgebildet ist ein gleitender Mittelwert aus 3 Einzelexperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf eine höhere Glucosekonzentration (Sekunde 600) wurde auf 100 %. Die umströmten Pankreasinseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Im weiteren Verlauf der Umströmung (Abb. 4.49.) entwickelte sich dann eine plateauförmige Erhöhung, bevor nach Absenkung der Glucosekonzentration auf 0 mM und einer Latenz von ca. 100 Sekunden die Signalintensität mit einer Geschwindigkeit von 2 E/min absank. Diese Absenkung erfolgte im Vergleich zu derjenigen registriert bei Raumtemperatur (s. Abb. 4.48.; 7,4 E/min) sehr langsam. Des weiteren konnte auch in Abbildung 4.49. eine vor und nach der Exposition erfolgende Abnahme der Fluoreszenzintensität registriert werden, die wieder auf das „Ausbleichen“ der Pankreasinsel („Fading“) zurückzuführen war.

Auch die Wirkung einer Temperaturerhöhung von Raumtemperatur auf $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ auf die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz in Langerhans'schen Inseln der Maus in Gegenwart von 20 mM Glucose wurde untersucht (Abb. 4.50.). Während der Exposition mit 20 mM

Glucose bei Raumtemperatur konnte über 1200 Sekunden ein steady state ausgebildet werden. Nach Erhöhung der Temperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ auf $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Perifusionsmedium konnte eine schnelle Absenkung der Signalintensität mit einer Geschwindigkeit von 1,3 E/min um ca. 13 % beobachtet werden. Weiterhin konnte auch im Kurvenverlauf der Einzelexperimente ein oszillatorisches Muster registriert werden. Nach Absenkung der Temperatur auf 22°C stieg die Signalintensität wieder mit einer Geschwindigkeit von 0,9 E/min an.

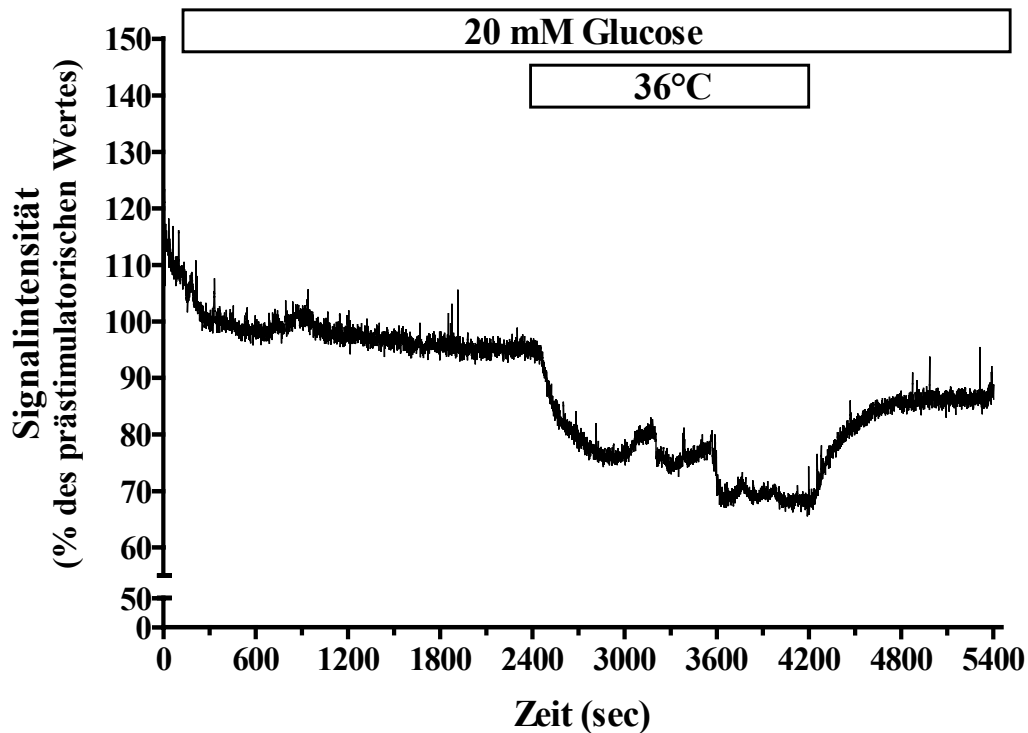


Abb. 4.50.: Absenkung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln der Maus durch Temperaturerhöhung. Die Insel wurde die gesamte Expositionsphase mit KR-Medium umströmt, das 20 mM Glucose enthielt (Sekunde 0-5400). In der Sekunde 2400 (Minute 40) wurde die Temperatur im Medium für 30 Minuten (bis Sekunde 4200) von Raumtemperatur auf $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ erhöht. Ab Sekunde 4200 (Minute 70) wurde die Temperatur im Medium wieder abgesenkt. Dargestellt ist die Signalintensität in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Sekunden. Abgebildet ist ein Mittelwert aus 3 Einzelexperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor der Erwärmung des Mediums (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

4.2.3.4 Bestimmung des NAD(P)H-Pools in der Pankreasinsel der Maus durch Exposition mit Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) und Oligomycin

Zur Bestimmung des NAD(P)H-Pools in einer Pankreasinsel der Maus wurde dem Perifusionsmedium 10 mM Glucose und 5 μM Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) zugesetzt wurde (Abb. 4.51.).

Wie im Kurvenverlauf des Mittelwertes dargestellt (Abb. 4.51.) konnte in Gegenwart von 10 mM Glucose eine geringe kontinuierliche Abnahme der Signalintensität registriert werden. Da die Pankreasinsel bei Raumtemperatur umströmt wurde, konnte auch im Einzelexperiment kein oszillatorisches Muster beobachtet werden. Mit einer Geschwindigkeit von 1,15 E/min sank die Signalintensität während der Exposition mit 5 μ M CCCP um ca. 23 % ab. Auffallend ist der zu Beginn dieser Expositionsphase auch in allen Einzelexperimenten registrierbare Versatz, möglicherweise ein durch CCCP induzierter Effekt. Eine Erholungsphase mit einem Wiederanstieg der Signalintensität konnte nach dem Aussetzen des Effektes von CCCP nicht beobachtet werden.

Dasselbe experimentelle Protokoll wurde auch eingesetzt, um den Effekt von 5 μ M CCCP bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ zu untersuchen (Grafik nicht dargestellt). Die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität sank dabei mit einer Geschwindigkeit von 1 E/min um ca. 10 % ab.

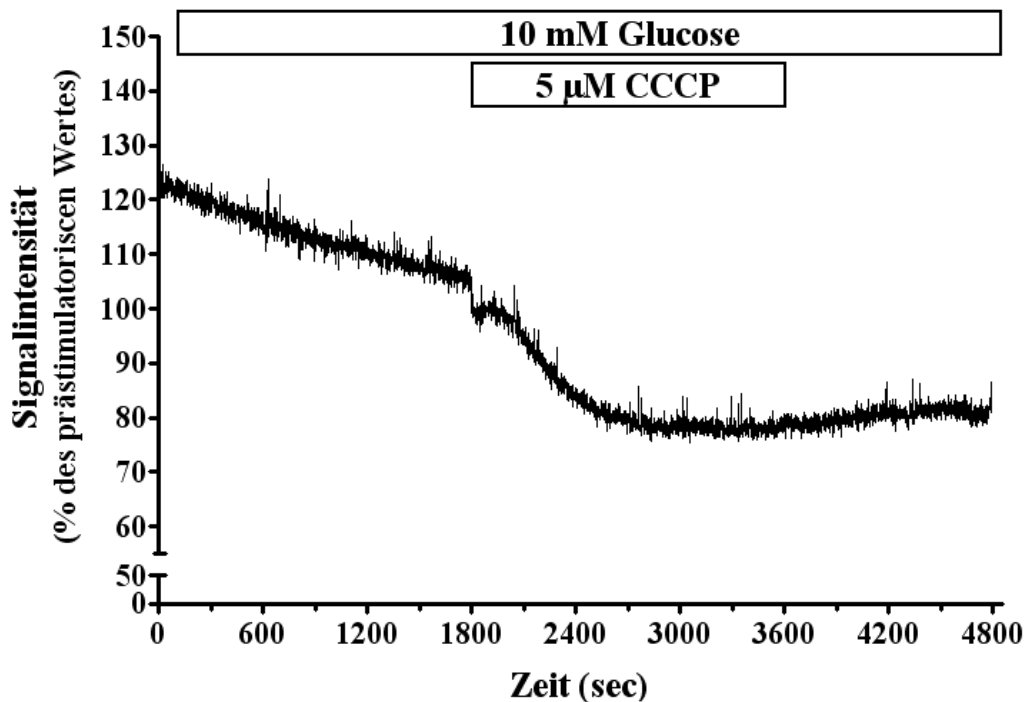


Abb. 4.51.: Absenkung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln der Maus durch CCCP bei Raumtemperatur. Die Insel wurde die gesamte Expositionsphase mit KR-Medium umströmt, das 10 mM Glucose enthielt (Sekunde 0-4800). In der Sekunde 1800 (Minute 30) wurde für 30 Minuten (bis Sekunde 3600) 5 μ M CCCP zugesetzt. Ab Sekunde 3600 (Minute 60) wurden 5 μ M CCCP ausgesetzt. Dargestellt ist die Signalintensität (%) in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Sekunden. Abgebildet ist ein Mittelwert ($n=4$). Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf den Entkoppler (Sekunde 1800) wurde auf 100 % gesetzt. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

In der nächsten Versuchsreihe wurde der Effekt von Oligomycin in Gegenwart von 30 mM Glucose auf die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in der Pankreasinsel untersucht (Abb. 4.52.). In Gegenwart von 10 mM Glucose konnte wieder eine kontinuierliche leichte Abnahme der

Signalintensität registriert werden und in den Einzelexperimenten konnten keine Oszillationen beobachtet werden, da die Umströmung wieder bei Raumtemperatur erfolgte. Nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf 30 mM konnte nur ein sehr geringer weiterer Anstieg der Signalintensität beobachtet werden. Die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Oligomycin in Gegenwart von 30 mM Glucose induzierte dann auch keinen zusätzlichen Anstieg der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in der Pankreasinsel.

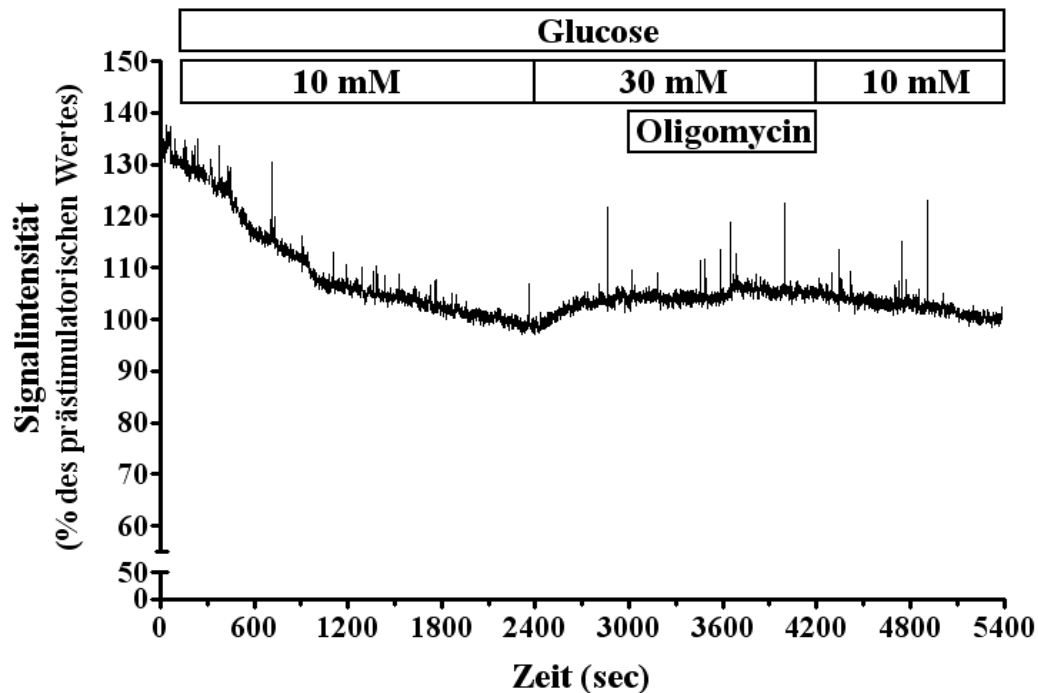


Abb. 4.52.: Fehlende Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in der Pankreasinsel der Maus durch Oligomycin bei Raumtemperatur. Die Insel wurde zunächst mit KR-Medium umströmt, das 10 mM Glucose enthielt (Sekunde 0-2400). In der Sekunde 2400 (Minute 40) wurde die Glucosekonzentration für 30 Minuten (bis Sekunde 4200) auf 30 mM erhöht, wobei diesem Medium ab Sekunde 3000 (Minute 50) für 20 Minuten 4 µg/ml Oligomycin zugesetzt wurde (Sekunde 3000-4200). Ab Sekunde 4200 (Minute 70) wurde wieder mit 10 mM Glucose perfundiert. Dargestellt ist die Signalintensität (%) in Abhängigkeit von der Perfusionszeit in Sekunden. Abgebildet ist ein Mittelwert (n=4). Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten von 10 mM auf 30 mM Glucose (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

4.2.3.5 Bestimmung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Langerhans'schen Inseln der Maus in Gegenwart von Glucose und 100 µM Efaroxan bei 37°C

Die Untersuchung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in der Pankreasinsel der Maus während der Umströmung mit dem Imidazolin Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose (Abb. 4.53.) und 10 mM Glucose (Abb. 4.54.) bei 37°C ergab folgende Ergebnisse:

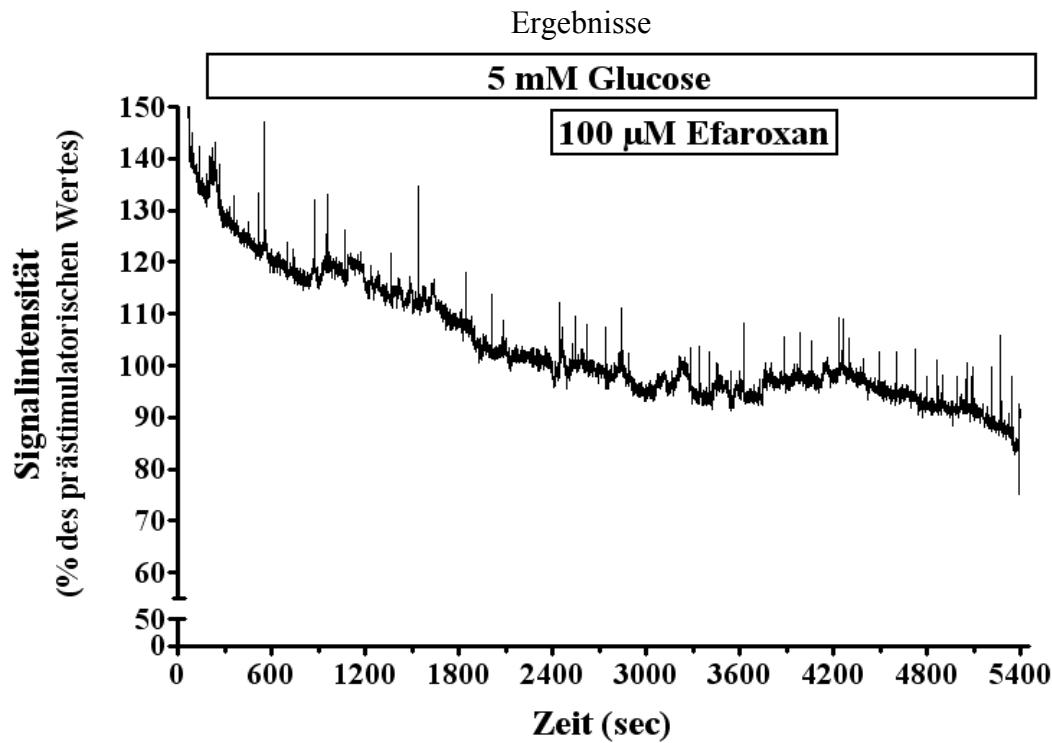


Abb. 4.53.: Die Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität durch Efaroxan bei 37°C. Die Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium umströmt, das 5 mM Glucose enthielt (Sekunde 0-5400). In der Sekunde 2400 (Minute 40) wurde diesem Medium für 30 Minuten (bis Sekunde 4200) 100 μ M Efaroxan zugesetzt. Dargestellt ist die Signalintensität (%) in Abhängigkeit von der Perifusionszeit (sec). Abgebildet ist ein Mittelwert ($n=5$). Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

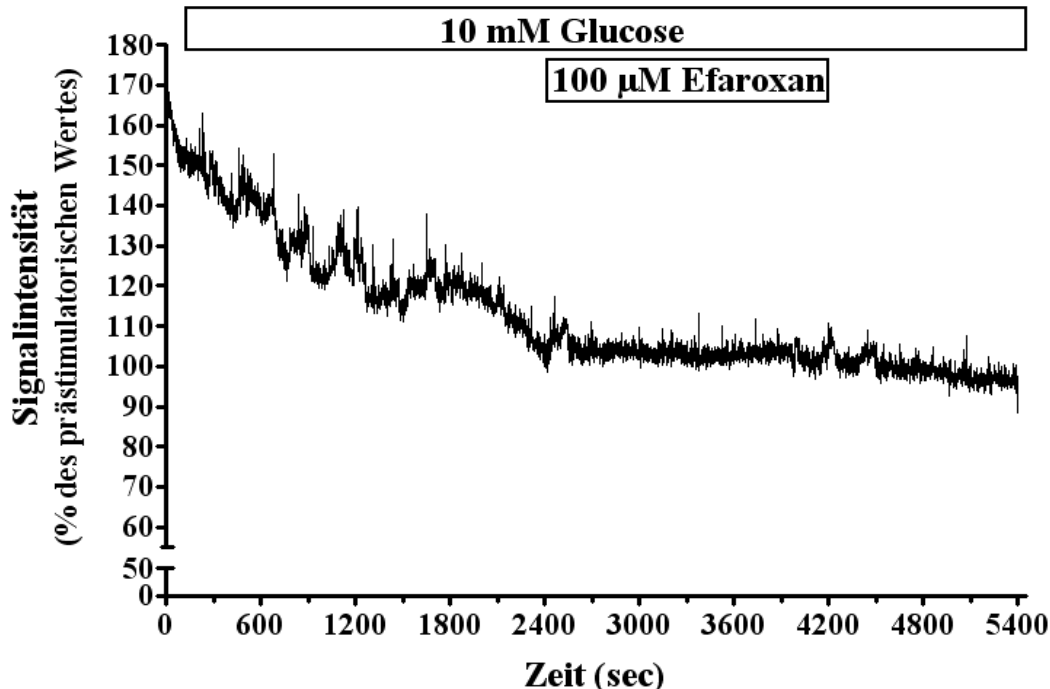


Abb. 4.54.: Die Änderung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in der Pankreasinsel der Maus durch Efaroxan bei 37°C. Die Insel wurde mit KR-Medium (mit 10 mM Glucose) umströmt (Sekunde 0-5400). In der Sekunde 2400 (Minute 40) wurde diesem Medium für 30 Minuten (bis Sekunde 4200) 100 μ M Efaroxan zugesetzt. Dargestellt ist die Signalintensität (%) in Abhängigkeit von der Perifusionszeit (sec). Abgebildet ist ein Mittelwert ($n=5$). Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt. Die Inseln wurden aus 2 verschiedenen Präparationen gewonnen.

Wie in Abbildung 4.53. dargestellt nahm die Signalintensität bei 37°C in Gegenwart von 5 mM Glucose mit einer Geschwindigkeit von 0,6 E/min langsam kontinuierlich ab. Während der Exposition mit 100 µM Efaroxan blieb die Signalintensität nahezu konstant, es konnten aber in dieser Expositionphase in den Einzelexperimenten oszillatorische Muster beobachtet werden. Diese Muster waren sogar im Mittelwert zu registrieren. In der Auswaschphase nahm die Signalintensität dann wieder kontinuierlich in Gegenwart von 5 mM Glucose und 37°C mit einer Geschwindigkeit von 0,7 E/min ab.

In Abbildung 4.54. ist dargestellt, wie in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration (10 mM) eine kontinuierliche Absenkung der Signalintensität mit einer Geschwindigkeit von 1 E/min erkennbar ist. In dieser Expositionsphase ist selbst im Mittelwert ein oszillatorisches Muster zu beobachten. Durch 100 µM Efaroxan konnte die kontinuierliche Abnahme der Signalintensität aufgehalten werden, es bildete sich ein Plateau auf niedrigem Niveau aus, eine „Stabilisierung“ der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität konnte beobachtet werden. In der Auswaschphase konnte dann wieder eine Abnahme der Signalintensität mit einer Geschwindigkeit von 0,6 E/min registriert werden.

4.3 Die Wirkung von freien Fettsäuren auf die Stimulus-Sekretions-Kopplung

4.3.1 Die Wirkung der Palmitinsäure auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus

Zur Untersuchung der Wirkung der Palmitinsäure auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion wurden frisch isolierte Pankreasinseln der Maus perifundiert. Der insulinotrope Effekt der Palmitinsäure wird durch die ungebundene bzw. freie Konzentration an Palmitat in der Perifusionslösung bestimmt (Warnotte et al., 1994). Deshalb war eine exakte Bestimmung der Albuminkonzentration im Testmedium vorzunehmen. Die Albuminkonzentration im Medium betrug 0,1 %, entsprechend 15,15 µM. Die Langerhans'schen Inseln wurden während des gesamten Messintervalls durch eine stimulatorische Glucosekonzentration (10 mM) in den aktivierten Zustand versetzt. Zwischen der 40. und 70. Minute wurde dann die Testsubstanz zugesetzt (Abb. 4.55.).

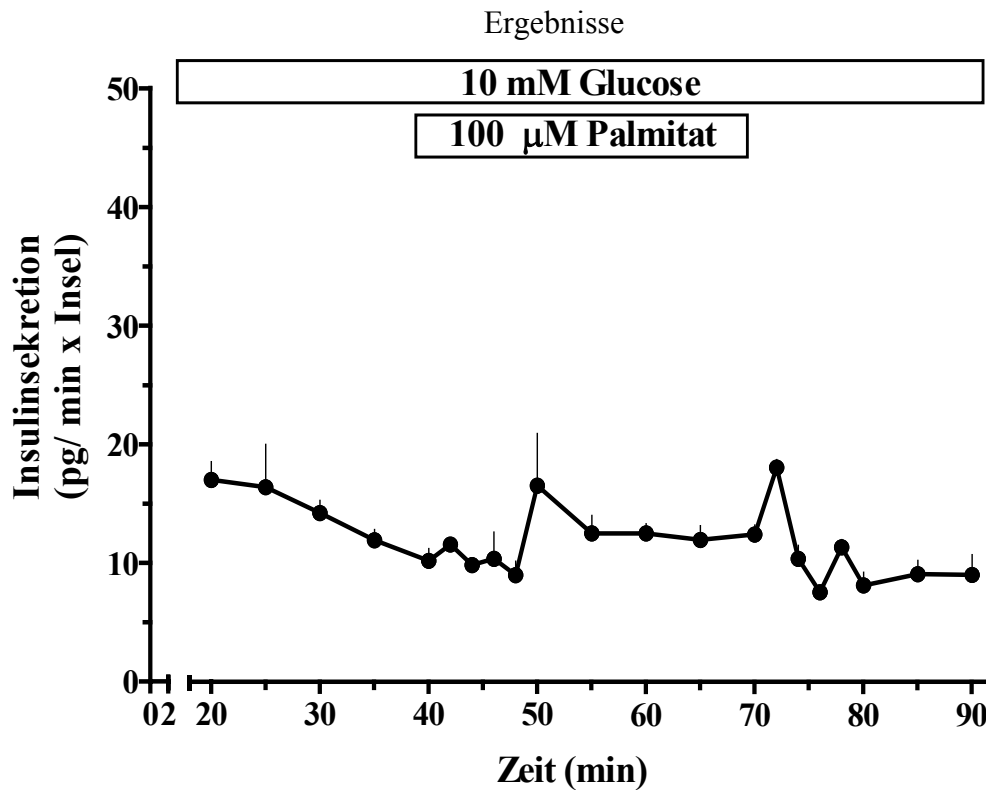


Abb. 4.55.: Steigerung der Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose durch Palmitinsäure. Frisch isolierte Pankreasinseln der Maus wurden von Minute 0 bis 90 mit KR-Lösung umströmt, die 10 mM Glucose enthält. Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 μ M Palmitat zugesetzt (Minute 40-70). Dargestellt ist die Insulinsekretion in pg/min x Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 3 Perfusionen.

Durch Palmitat konnte nach einer Latenz von ca. 8 Minuten eine Steigerung der Glucose-stimulierten Insulinsekretion induziert werden (Abb. 4.55.), es kam dann spontan zu einem leichten Abfall und es entwickelte sich eine Plateauphase auf niedrigem Niveau. Das Aussetzen des Palmitat-induzierten Effektes trat annähernd mit der gleichen Kinetik ein wie die induzierte Erhöhung der Insulinsekretion, es kam zu einer Verringerung der Sekretion auf prästimulatorische Werte.

4.3.1.1 Einfluss von 2-Bromopalmitinsäure auf die Glucose-stimulierte Insulinsekretion in Gegenwart von Palmitat

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob 100 μ M 2-Bromopalmitinsäure den insulintropen Effekt der Palmitinsäure antagonisieren kann. Wie in der Abbildung 4.56. dargestellt konnte der steigernde Effekt von Palmitat auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 10 mM Glucose - wie bereits in Abbildung 4.55. vorgestellt - erneut beobachtet werden: nach einer Verzögerung von ca. 5 Minuten konnte durch Palmitat insgesamt ein Zuwachs der Sekretionsrate um ca. 75 % registriert werden.

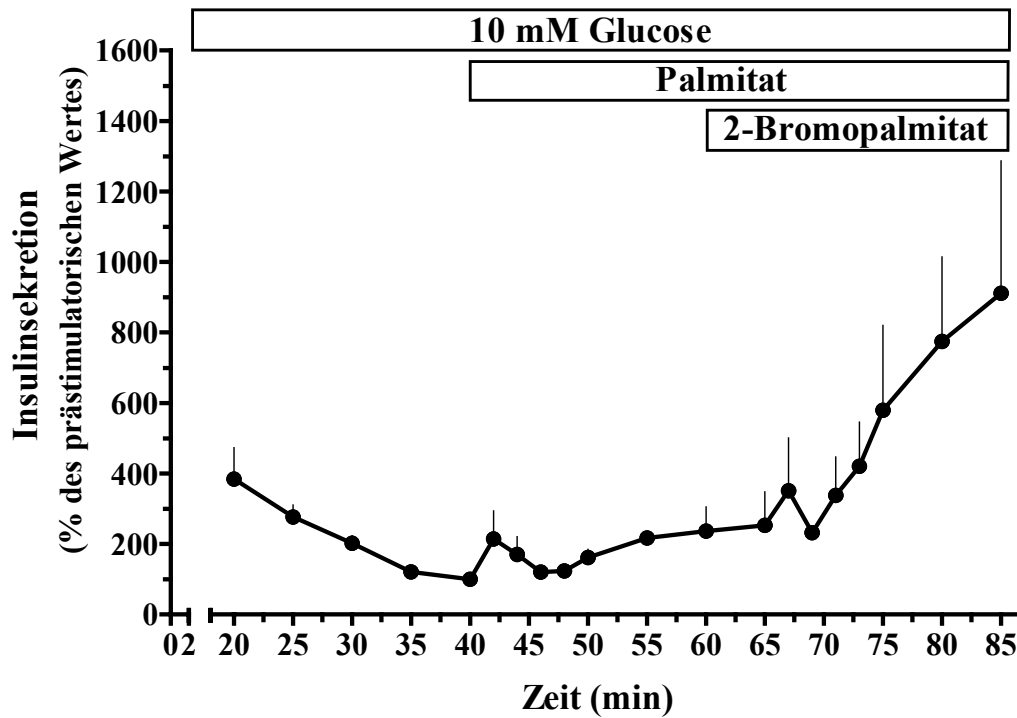


Abb. 4.56.: Modifizierung des Palmitat-induzierten Effektes auf die Insulinsekretion durch 2-Bromopalmitinsäure. Frisch isolierte Pankreasinseln der Maus wurden von Minute 0 bis 85 mit Krebs-Ringer-Lösung umströmt, die 10 mM Glucose enthielt. Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 μ M Palmitat zugesetzt (Minute 40 bis 85), ab Minute 60 zusätzlich 100 μ M 2-Bromopalmitat. Dargestellt ist die Insulinsekretionsrate in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten. Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 40) wurde auf 100 % gesetzt.

Die Insulinsekretionsrate konnte auch durch die Exposition mit 100 μ M 2-Bromopalmitat - bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μ M Palmitat - nicht reduziert werden, vielmehr stieg die Insulinsekretionsrate nach ca. 9 Minuten schnell und kontinuierlich an, bis gegen Ende der Perifusion ein Zuwachs von über 500 % des prästimulatorischen Wertes erreicht wurde. Zur Ausbildung eines steady states reichte die Dauer der Perifusion dann nicht aus.

4.3.1.2 Der Efaroxan-induzierte Effekt auf die Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose und 100 μ M Palmitinsäure

In dieser Versuchsreihe wurde untersucht, ob der Effekt des Imidazolins Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose auf die Insulinsekretion in der Pankreasinsel der Maus durch Anwesenheit von Palmitat beeinflusst werden konnte (Abb. 4.57.).

Ergebnisse

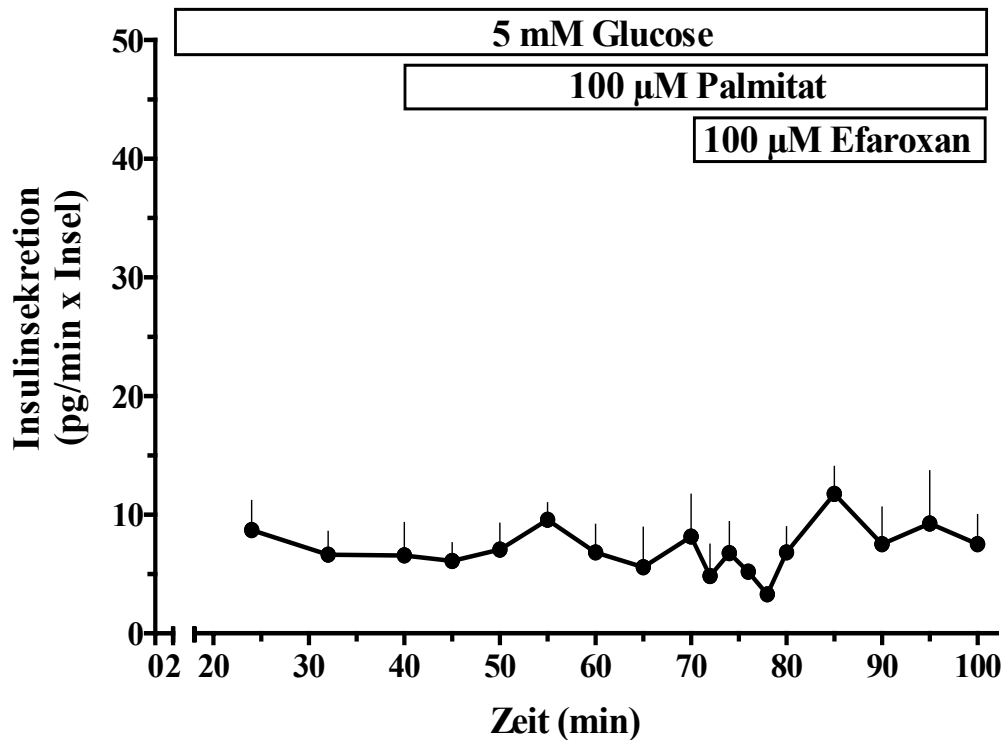


Abb. 4.57.: Fehlender Effekt von Efaroxan auf die Insulinsekretion in Gegenwart von Palmitat und Glucose. Frisch isolierte Pankreasinseln der Maus wurden von Minute 0 bis 100 mit KR-Lösung umströmt, die 5 mM Glucose enthielt. Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 µM Palmitat zugesetzt (Minute 40 bis 100), ab Minute 70 zusätzlich 100 µM Efaroxan. Dargestellt ist die Insulinsekretion in pg/min x Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 3 Einzelexperimenten.

Wie in der Abbildung 4.57. dargestellt, konnten 100 µM Palmitat in Gegenwart von 5 mM Glucose keine nennenswerte Erhöhung der Insulinsekretion bewirken. Interessanterweise führte dann auch die Exposition mit 100 µM Efaroxan in Gegenwart von Palmitat und Glucose zu keiner Stimulation der Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus.

4.3.2 Wirkung von Palmitat und 2-Bromopalmitat auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln der Maus

Die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus durch 100 µM Palmitat in Gegenwart von 10 mM Glucose wurde bei Raumtemperatur untersucht. Wie in Abbildung 4.58. zu beobachten entwickelten sich Glucose-induzierte synchrone, niederfrequente ($x_{(n=3)}=0,29/\text{min}$) und regelmässig auftretene cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen. Die Niveaus der einzelnen ROI's lagen nahe beieinander, Minima und Maxima der Amplituden der Oszillationen der Teilbereiche unterschieden sich kaum. Die Minima der Amplituden der Glucose-induzierten Oszillationen lagen durchschnittlich bei Ratio-Werten um 45, die Maxima bei Ratio-Werten um 105.

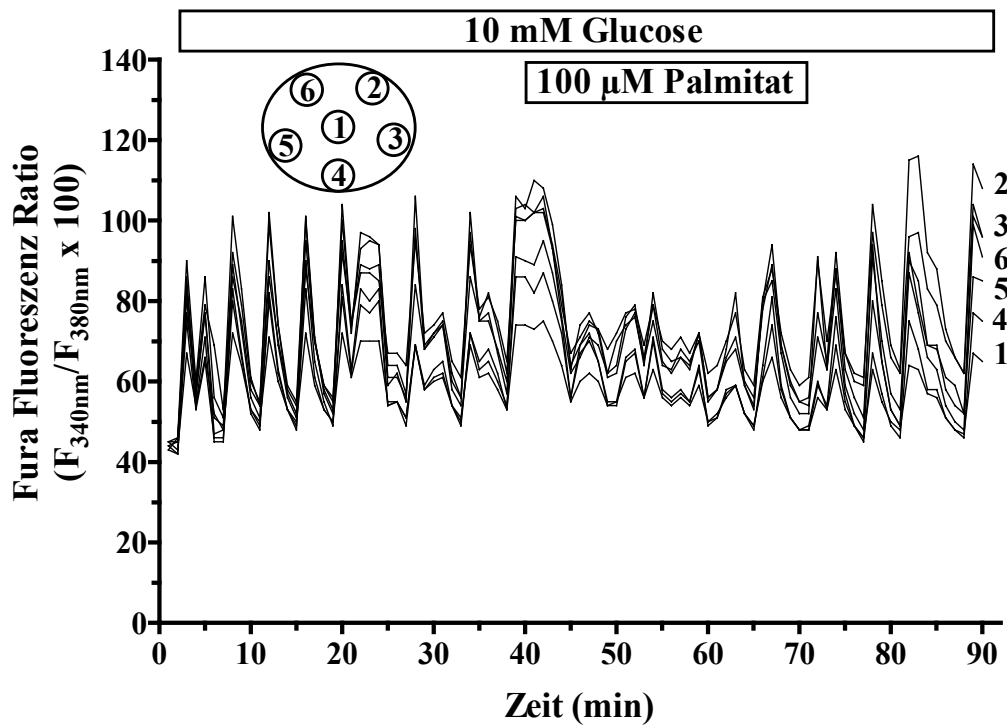


Abb. 4.58.: Modifizierende Wirkung von Palmitinsäure auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von Glucose bei Raumtemperatur. Die kultivierte und mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 10 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 90). Ab Minute 40 wurde diesem Medium für 30 Minuten 100 μ M Palmitat zugesetzt. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für 2 weitere Umströmungen.

Bei gleichzeitiger Exposition mit 100 μ M Palmitat kam es zu einer deutlichen Abnahme der Ratio-Werte der Maxima der Amplituden auf nur noch 75. Nach dem Aussetzen des Palmitat-induzierten Effektes konnten wieder Ca^{2+} -Oszillationen im Cytosol beobachtet werden, deren Amplituden mit denjenigen vergleichbar waren, die bereits vor der Exposition mit Palmitat induziert wurden.

Dasselbe experimentelle Protokoll wurde zur Untersuchung des Effektes von 2-Bromopalmitat auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Pankreasinseln der Maus in Gegenwart von 10 mM Glucose verwendet (Abb. 4.59.). Es konnten wieder die Glucose-induzierten synchronen, niederfrequenten ($x_{(n=3)}=0,32/\text{min}$) und regelmässig auftretenden Ca^{2+} -Oszillationen mit Amplituden um $\Delta 60$ (45 - 105) beobachtet werden. Durch die zusätzliche Exposition mit 100 μ M 2-Bromopalmitat sank nach 5 Minuten die Frequenz der Ca^{2+} -Oszillationen ab und auch die Amplitudengrösse der einzelnen Oszillationen nahm ab. Es konnten nur noch Amplituden um $\Delta 20$ (60 - 80) beobachtet werden. Ab Minute 60 stieg die Frequenz wieder an und nach dem Aussetzen des Bromopalmitat-Effektes entwickelten sich wieder Oszillationen mit Amplituden um $\Delta 50$ (45 - 95).

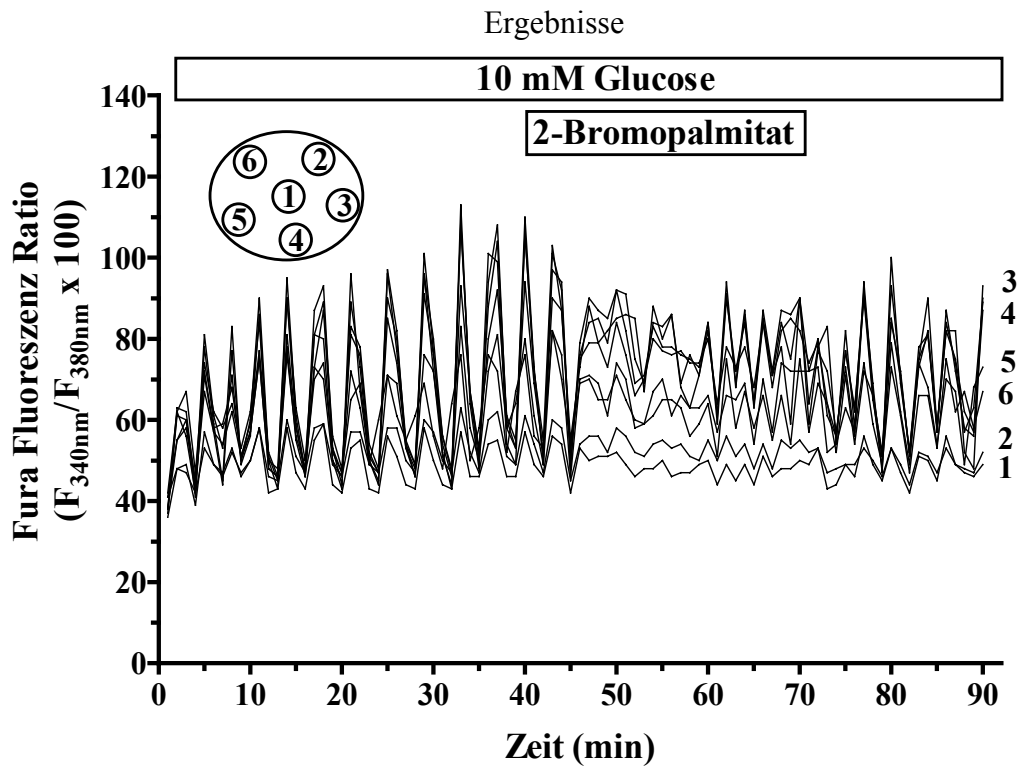


Abb. 4.59.: Modifizierende Wirkung von 2-Bromopalmitinsäure auf die $[Ca^{2+}]_i$ in Gegenwart von Glucose bei Raumtemperatur. Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 10 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0 bis 90). Ab Minute 40 wurde diesem Medium für 30 Minuten 100 μ M 2-Bromopalmitat zugesetzt. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für 2 weitere Umströmungen.

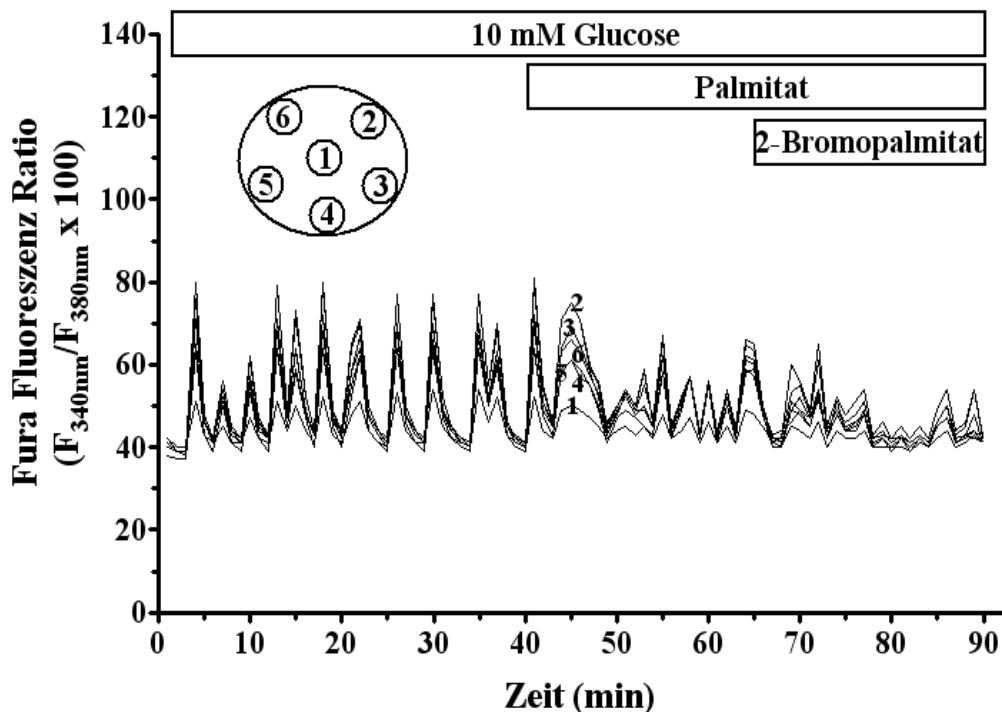


Abb. 4.60.: Verstärkung des Palmitat-induzierten Effektes auf die $[Ca^{2+}]_i$ durch 2-Bromopalmitat. Die mit Fura-2 beladene Pankreasinsel der Maus wurde mit KR-Medium, das 10 mM Glucose enthielt, umströmt (Minute 0-90). Ab Minute 40 wurde diesem Medium 100 μ M Palmitat zugesetzt, ab Minute 65 zusätzlich 100 μ M 2-Bromopalmitat. Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für insgesamt 4 Umströmungen.

Es wurde dann untersucht, ob der Palmitat-induzierte Effekt durch 2-Bromopalmitinsäure antagonisierbar ist (Abb. 4.60.). Der bereits beschriebene Palmitat-induzierte Effekt auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in der Pankreasinsel der Maus (s. Abb. 4.58.) konnte auch in dieser Grafik erneut beobachtet werden: Die Amplituden der Glucose-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen im Cytosol nahmen während der Expositionsphase mit 100 μM Palmitat von maximal $\Delta 40$ (40 - 80) auf durchschnittlich $\Delta 30$ (40-70) ab. Durch 100 μM 2-Bromopalmitat konnte dieser Effekt verstärkt werden: die Amplituden der cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen nahmen weiter ab, sie lagen dann durchschnittlich bei $\Delta 15$ (40 - 55).

Das folgende experimentelle Protokoll - dargestellt in Abbildung 4.61. - diente der Konkretisierung der Konzentrationsabhängigkeit der Palmitat-induzierten Wirkung auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Langerhans'schen Insel der Maus.

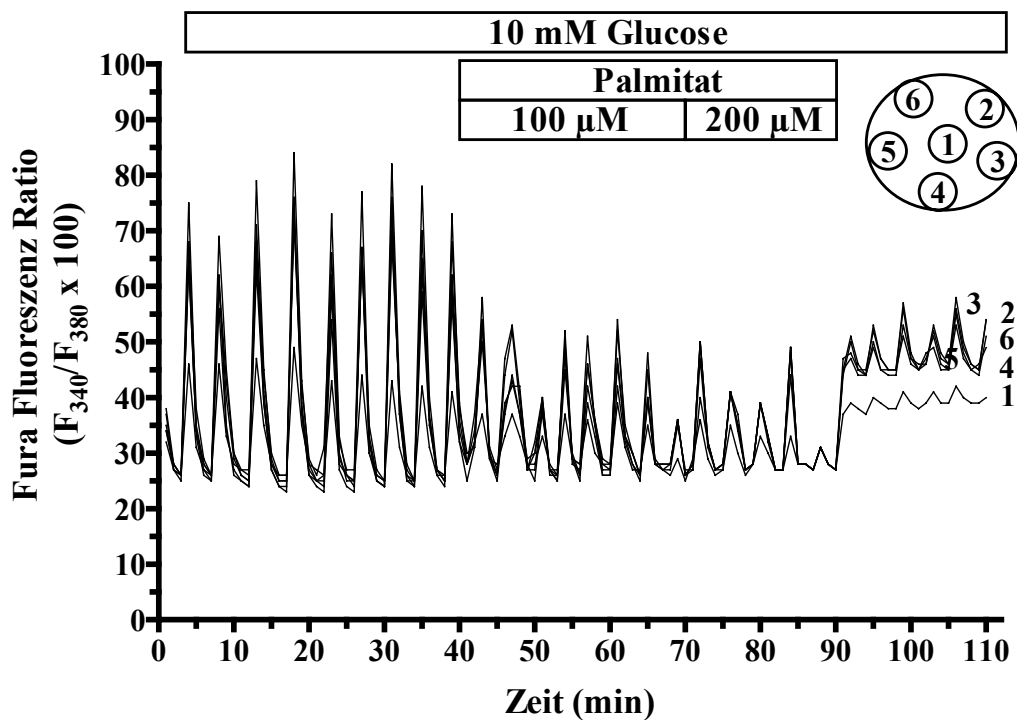


Abb. 4.61.: Konzentrationsabhängiger Effekt von Palmitinsäure auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Gegenwart von Glucose bei Raumtemperatur. Die kultivierte, mit Fura-2 beladene Pankreasinsel (Maus) wurde mit KR-Medium (mit 10 mM Glucose) umströmt (Minute 0-110). In der Minute 40 wurde diesem Medium für 30 Minuten 100 μM Palmitat zugesetzt, in der Minute 70 wurde dann die Konzentration des Palmitats im Perifusionsmedium verdoppelt (Minute 70-90). Die Fura-Fluoreszenz-Ratio ist in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten dargestellt. Abgebildet ist ein Einzelexperiment, das repräsentativ ist für 2 weitere Umströmungen.

Erneut konnten die Glucose-induzierten synchronen, niederfrequenten ($x_{(n=3)}=0,29/\text{min}$) und regelmässig auftretenden Ca^{2+} -Oszillationen im Cytosol der Langerhans'schen Insel beobachtet werden. Die Niveaus insbesondere der Minima der Amplituden der Oszillationen der einzelnen ROI's waren fast durchgehend identisch. Die Amplituden dieser Oszillationen

lagen durchschnittlich bei $\Delta 50$ (25 - 75). Während der zusätzlichen Exposition mit 100 μM Palmitat konnte eine deutliche Reduktion der Amplituden der Ca^{2+} -Oszillationen um die Hälfte registriert werden, die Amplituden lagen nur noch bei $\Delta 25$ (25 - 50). Auch 200 μM Palmitat induzierten eine weitere, wenn auch geringfügigere Reduktion der Amplituden der Oszillationen, die Amplituden lagen bei $\Delta 15$ (25 - 40).

4.3.3 Untersuchung des Effektes zweier langkettiger Fettsäuren auf den NAD(P)H-Pool in der Pankreasinsel der Maus in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration (10 mM) bei Raumtemperatur

Nach dem unter 4.3.1. dokumentierten experimentellen Befund der Steigerung der Insulinsekretion in Pankreasinseln der Maus in Gegenwart von 10 mM Glucose induziert durch 100 μM Palmitat stellte sich die Frage, ob sich der NAD(P)H-Pool in den B-Zellen der Langerhans'schen Inseln in Gegenwart von 10 mM Glucose und 100 μM Palmitat veränderte.

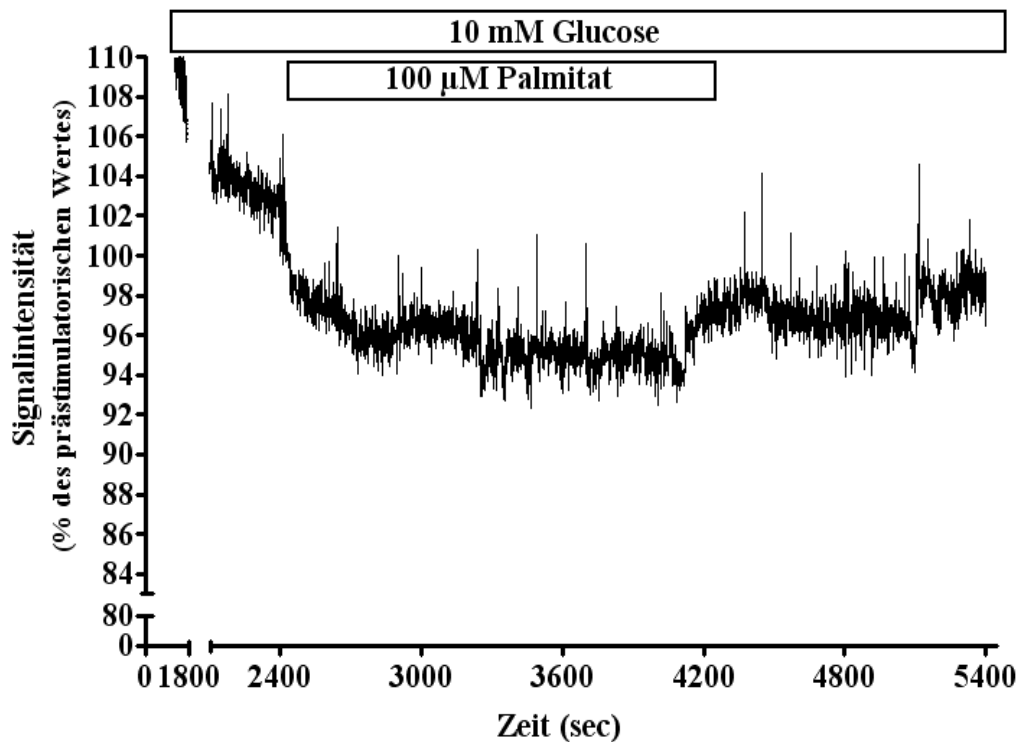


Abb. 4.62.: Abnahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in einer Pankreasinsel der Maus durch Palmitinsäure. Die kultivierte Insel wurde mit Krebs-Ringer-Medium, das 10 mM Glucose enthielt, umströmt (Sekunde 0 bis 5400). Diesem Medium wurde für ca. 27 Minuten 100 μM Palmitat zugesetzt (Sekunde 2400 bis 4000). Dargestellt ist die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden. Angegeben ist ein Mittelwert aus 4 Einzelexperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt.

Wie in Abbildung 4.62. dargestellt nahm die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz - bezogen auf die Signalintensität registrierbar in Gegenwart von 10 mM Glucose alleine - während der zusätzlichen Exposition mit 100 μ M Palmitat innerhalb sehr kurzer Zeit um ca. 5 % ab. Dann entwickelte sich ein Plateau über die gesamte Expositionsphase aus. Nach dem Aussetzen des Palmitat-induzierten Effektes konnte ein Wiederanstieg der Signalintensität um ca. 5 % registriert werden. Auffallend ist erneut, dass während der Umströmung eine kontinuierliche Fluoreszenzabnahme vor und nach der Exposition mit Palmitat beobachtet werden konnte, die vermutlich wieder zurückzuführen ist auf das „Ausbleichen“ der Pankreasinsel („Fading“) während der Umströmung (s. Methodenteil).

Zur Untersuchung des Effektes von 2-Bromopalmitat auf die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz wurde dasselbe experimentelle Protokoll wie in Abbildung 4.62. dargestellt verwendet (Abb. 4.63.).

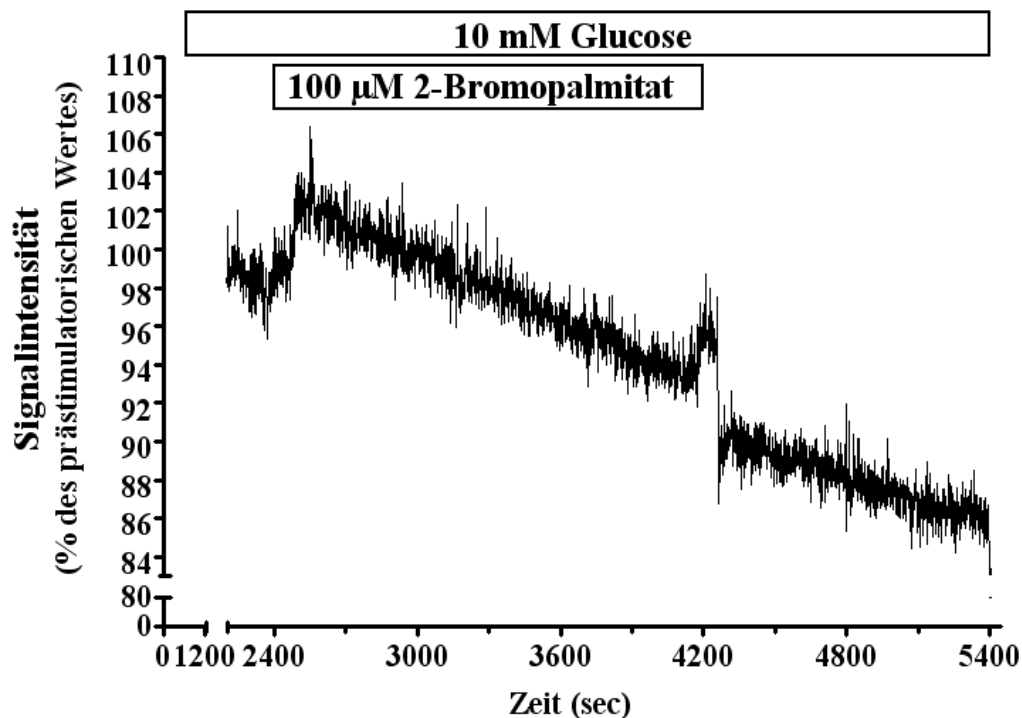


Abb. 4.63.: Erhöhung der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in einer Pankreasinsel der Maus durch 2-Bromopalmitinsäure. Die kultivierte Insel wurde mit KR-Medium, das 10 mM Glucose enthielt, umströmt (Sekunde 0 bis 5400). Diesem Medium wurde für ca. 27 Minuten 100 μ M 2-Bromopalmitat zugesetzt (Sekunde 2400 bis 4000). Dargestellt ist die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden. Angegeben ist ein Mittelwert aus 3 Einzelexperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt.

Durch 100 μ M 2-Bromopalmitat konnte in Gegenwart von 10 mM Glucose innerhalb von zwei Minuten ein Anstieg der Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz um ca. 4 % in Pankreasinseln beobachtet werden (Abb. 4.63.). Dann entwickelte sich ein Plateau und in der

Ergebnisse

Auswaschphase sank die Signalintensität wieder um denselben Betrag ab. Auch während dieser Umströmung konnte wieder eine kontinuierliche Fluoreszenzabnahme vor und nach der Exposition mit 2-Bromopalmitat beobachtet werden („Fading“).

Mit Hilfe eines weiteren experimentellen Protokolls wurde dann untersucht, ob der Palmitat-induzierte Effekt durch 2-Bromopalmitat antagonisierbar war. Eine solche Antagonisierbarkeit konnte nicht beobachtet werden (Grafik nicht abgebildet).

Schliesslich wurde der Palmitat-induzierte Effekt in Pankreasinseln der Maus in Gegenwart von 10 mM Glucose (Abb. 4.64.) und 20 mM Glucose (Abb. 4.65.) bei 37°C untersucht.

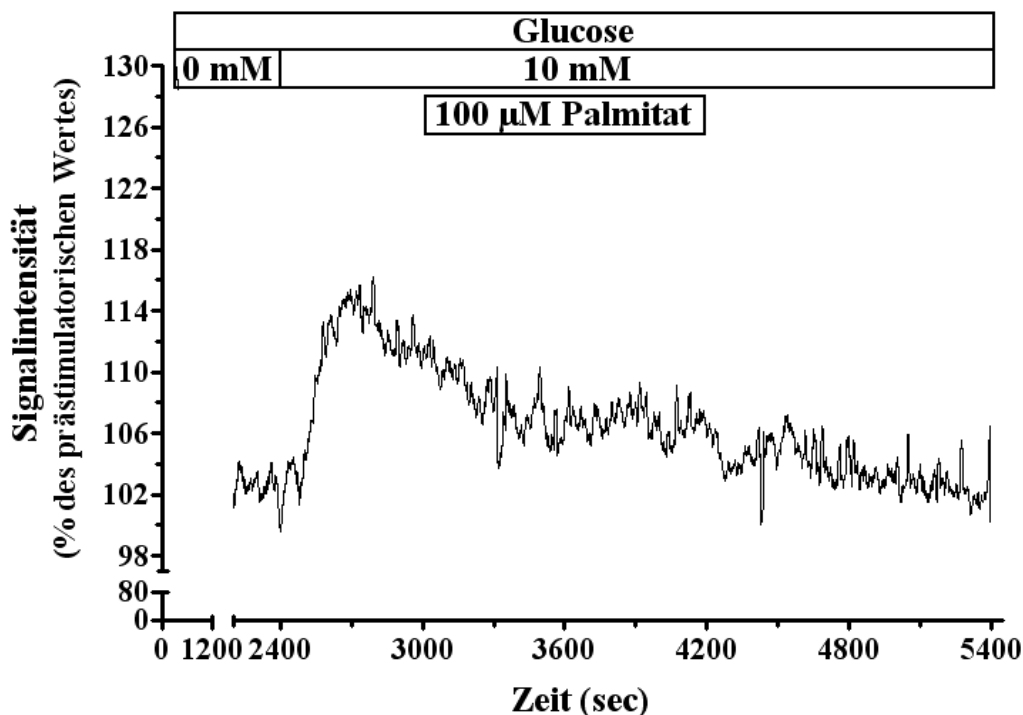


Abb. 4.64.: Abnahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in einer Pankreasinsel der Maus durch Palmitat. Die kultivierte Insel wurde zu Beginn der Perifusion mit KR-Medium, das 0 mM Glucose enthielt, umströmt (Sekunde 0-2400), dann mit 10 mM Glucose (Sekunde 2400-5400). Diesem Medium wurde für 20 Minuten 100 µM Palmitat zugesetzt (Sekunde 3000-4200). Dargestellt ist die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden. Angegeben ist ein Mittelwert aus 4 Einzelerperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf 10 mM Glucose (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt.

Nach Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 10 mM stieg die Signalintensität mit einer Geschwindigkeit von 3 E/min um ca. 15 % an. Die Fluoreszenzintensität nahm dann spontan leicht ab. Durch 100 µM Palmitat konnte dieser Abfall nach einer Latenz von ca. 5 Minuten aufgehalten werden. In der Auswaschphase setzte sich die in Gegenwart von 10 mM Glucose bereits aufgetretene kontinuierliche Absenkung weiter fort.

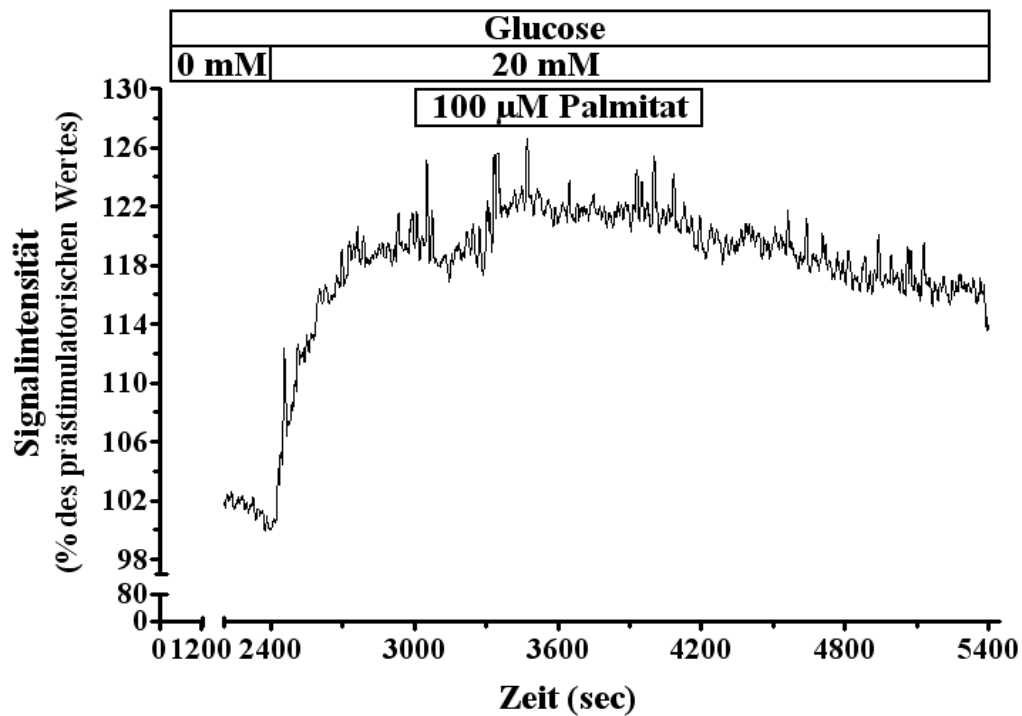


Abb. 4.65.: Zunahme der NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in einer Pankreasinsel der Maus durch Palmitinsäure. Die kultivierte Insel wurde zu Beginn der Perifusion mit Krebs-Ringer-Medium, das 0 mM Glucose enthielt, umströmt (Sekunde 0 bis 2400), dann mit 20 mM Glucose (Sekunde 2400 bis 5400). Diesem Medium wurde für 20 Minuten 100 µM Palmitat zugesetzt (Sekunde 3000 bis 4200). Dargestellt ist die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz in Prozent in Abhängigkeit von der Zeit in Sekunden. Angegeben ist ein Mittelwert aus 4 Einzelexperimenten. Die Signalintensität der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf 20 mM Glucose (Sekunde 2400) wurde auf 100 % gesetzt.

Die Erhöhung der Glucosekonzentration von 0 mM auf 20 mM führte mit einer Geschwindigkeit von 3,8 E/min zu einer Zunahme der Signalintensität um fast 19 % (Abb. 4.65.). Durch 100 µM Palmitat stieg die Fluoreszenzintensität mit einer Geschwindigkeit von 8 E/min um ca. 3 % an. Es bildete sich in dieser Expositionsphase eine plateauförmige Erhöhung aus. In der Auswaschphase sank die Signalintensität dann sehr langsam - nur mit einer Geschwindigkeit von 0,3 E/min - auf die Ausgangswerte ermittelt in Gegenwart von 20 mM Glucose zurück.

5 Diskussion

5.1 Methodische Betrachtungen zur Verwendung von intakten Pankreasinseln in der Messung von $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen in B-Zellen

Die in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Untersuchungen wurden an intakten, aus dem Pankreas der NMRI-Maus isolierten Inseln durchgeführt, obgleich diese Pankreasinseln mehrzellige Aggregate darstellen, die u. a. aus A-, B- und D-Zellen bestehen. Somit ist eine Beeinträchtigung des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals der B-Zellen durch die anderen Zelltypen nicht ganz auszuschliessen. Da aber diesem Einwand zahlreiche - im folgenden beschriebene - Vorteile gegenüberstanden, wurde die Langerhans'sche Insel als Messobjekt gewählt: 1.) Es ist von Bedeutung, dass die Pankreasinsel auch hinsichtlich der Sekretion als relevante Einheit diene (s. Material und Methoden, Kapitel 3.2.1), so dass Messungen von $[Ca^{2+}]_i$ -Signalen in B-Zellen in Pankreasinseln einen direkten Vergleich mit den Ergebnissen aus den experimentellen Untersuchungen zur Bestimmung der Insulinsekretionsrate ermöglichen. 2.) Untersuchungen an der intakten Langerhans'schen Insel schließen Interaktionen der in diesem mehrzelligen Aggregat enthaltenen Zellgruppen untereinander ein. Die Effekte an nicht-dispergierten B-Zellen in einer intakten Pankreasinsel sind den tatsächlichen physiologischen Gegebenheiten näher als Effekte, die an einzelnen B-Zellen - isoliert aus dem Zellverband - durchgeführt werden (Arkhammar et al., 1998; Pipeleers et al., 1982). 3.) Eine intakte Pankreasinsel ist ein geeignetes Messobjekt, um die noch weitgehend unklaren Ursachen und Wirkungen synchroner cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen zu untersuchen (Gilon und Henquin, 1992; Gilon et al., 1994; Fernandez und Valdeolmillos, 2000; Gilon et al., 2002; Ravier et al., 2002). 4.) Obgleich die Auslösung der Oszillationen bereits von einer einzelnen B-Zelle induziert werden kann (Ainscow und Rutter, 2002; Porksen et al., 2002), ist bereits bekannt, dass die durch gap junctions induzierte elektrophysiologische Kopplung der B-Zellen untereinander innerhalb der Pankreasinsel Einfluss auf das oszillatorische Muster hat (Meissner, 1976; Gilon et al., 1999; Ravier et al., 2005), wobei die Induktion von Oszillationen auch als Nachweis der funktionellen Integrität von Pankreasinseln gilt. Insbesondere der Effekt bestimmter Imidazoline und Fettsäuren auf das oszillatorische Muster in intakten Langerhans'schen Inseln war in diesem Zusammenhang von Interesse.

5.1.1 Massnahmen zur Eindämmung der Beeinträchtigung der funktionellen Integrität der Pankreasinseln der Maus durch Kultivierungsbedingungen

Es gibt Hinweise darauf, dass die Kultivierungsdauer und die Kultivierungsbedingungen - vor allem die gewählte Glucosekonzentration während der Kultivierungsphase - den Charakter des Glucose-induzierten intrazellulären Calciumanstiegs in Langerhans'schen Inseln beeinflussen können (Gilon et al., 1994): Weniger die Anstiege der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration der 1. Phase als vielmehr die cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen insbesondere in ihrer Frequenz und Amplitude waren häufig unregelmässig, wenn die Glucosekonzentration während der Kultivierungsphase 10 mM und die Dauer der Kultivierung ≥ 120 h betrug (Gilon et al., 1994). Deshalb wurden für die experimentellen Untersuchungen in dieser Arbeit lediglich Pankreasinseln nach einer Kultivierungsperiode von 24 h bis 48 h, gelegentlich bis zu 72 h verwendet. Und auch die Wahl der Glucosekonzentration von 5 mM diene dazu, den Glucosestoffwechsel während der Kultivierungsperiode nicht zu stimulieren (Gilon et al., 1994). Zudem wurden in jeder Versuchsreihe Pankreasinseln aus jeweils zwei verschiedenen Präparationen perifundiert (s. Ergebnisse), denn es konnte belegt werden, dass nur Inseln aus einer Präparation in sich homogen sind und dass das oszillatorische Muster in Inseln aus zwei verschiedenen Präparationen unter den gleichen Versuchsbedingungen unterschiedlich ausgeprägt sein kann (Nunemaker et al., 2005). Ausserdem wurden für die Perfusionen möglichst kleine Langerhans'sche Inseln verwendet (s. Kapitel 3.3.2.4, Abb. 3.5.), da sich gezeigt hat, dass Pankreasinseln mit geringem Durchmesser während ihrer Kultivierungsphase weniger oft in ihrer funktionellen Integrität beeinträchtigt werden (Gilon et al., 1994) und die Beladung mit dem Indikator wesentlich homogener verläuft (Gilon et al., 1994; Nadal et al., 1999; Abb. 4.1.). Da zudem die experimentellen Befunde der Perfusionen an frisch isolierten Pankreasinseln (Abb. 4.7.) mit den Ergebnissen aus den Perfusionen an kultivierten Pankreasinseln (Abb. 4.21.B.) insbesondere bezüglich der Induktion cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen übereinstimmten, kann davon ausgegangen werden, dass die funktionelle Integrität der Pankreasinseln bei begrenzter Kultivierungsdauer ganz überwiegend bestehen bleibt. Wie in Abbildung 4.2. und 4.4. dargestellt konnten durch die Gegenwart von 10 mM Glucose nach einer Latenzzeit von ca. 15 Minuten synchrone und niederfrequente cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen induziert werden, wobei diese Latenzzeit darin begründet sein könnte, dass das zur Koordination der Funktion der gap junctions notwendige ATP erst nach Aktivierung des Energiestoffwechsels durch Glucose in ausreichenden Mengen vorlag. Sowohl die Induktion cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen (Abb. 4.2. und Abb. 4.4.) als auch die

durch eine K^+ -Depolarisation induzierte Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 4.2.) belegen die funktionelle Integrität der Langerhans'schen Inseln nach der Kultivierung. Die in Abbildung 4.4. zu beobachtene zunehmende Divergenz und fehlende Kopplung der einzelnen Teilbereiche der Pankreasinsel untereinander in Gegenwart von 5 mM Glucose hingegen macht deutlich, dass die Langerhans'schen Inseln nicht immer lange haltbar waren und empfindlicher reagierten als einzelne B-Zellen.

Ein besonderes Phänomen stellte der kontinuierliche Anstieg der Fluoreszenzratio während der Umströmungen der Pankreasinseln dar, der wiederholt in den Sommermonaten zu beobachten war, wenn die Umgebungstemperatur im Labor erhöht war (Abb. 4.11.). Vermutlich handelte es sich um einen Ausstrom vom Fluoreszenzfarbstoff aus geschädigten Zellen. Dabei wird der am Ca^{2+} -Ion gebundene Indikator Fura-2 in zunehmenden Ausmass aus der B-Zelle freigesetzt. Dieser Ca^{2+} -Indikator-Komplex verteilt sich im interzellulären Raum der Pankreasinsel und tritt auch aus der gesamten Langerhans'schen Insel aus. Damit gibt der Indikator die hohe extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wieder. Eine Massnahme zur Eindämmung dieses als „leakage“ bekannten Phänomens (Jakob et al., 1998; Manzini und Schild, 2002) war die Beladung der Pankreasinsel mit dem Fluoreszenzindikator Fura-PE3 (Abb. 4.12.) anstatt mit Fura-2 (Abb. 4.11.). Fura-PE3 enthält einen Piperazinring, dessen Stickstoff mit den benachbarten Carboxylgruppen zur Bildung eines Zwitterions führt und damit länger in der Zelle verbleibt (s. Material u. Methoden, Kapitel 3.3.2.2). Mit solcherart beladenen Pankreasinseln blieb der Anstieg der Fura-Ratio aus bzw. war stark vermindert. Da dieses Phänomen oft nur in den Sommermonaten beobachtet werden konnte, ist die Vermutung naheliegend, dass die Schädigung der Langerhans'schen Inseln durch zu starke Erwärmung während der Isolierungsphase - insbesondere beim Sammeln der Pankreasinseln unter dem Stereomikroskop - erfolgt, so dass zu prüfen wäre, ob eine Isolierung unter Kühlung zur Besserung der funktionellen Integrität von Pankreasinseln führt. Des weiteren trat rückblickend zutage, dass neben der saisonalen Komponente vermutlich auch das Collagenase-Digestionsverfahrens nach Gotoh et al. (1985) („Injektionsverfahren“, s. Material und Methoden, Kapitel 3.1.8.1) dazu beitrug, dass ein kontinuierlicher Anstieg in der Fluoreszenzratio entstehen konnte. Es ist zumindest offensichtlich, dass nur die Umströmungen mit den so gewonnen Pankreasinseln einen Anstieg der Fluoreszenzratio zeigten (Abb. 4.40., Abb. 4.42. und Abb. 4.43.). Interessanterweise konnte des weiteren beobachtet werden, dass auch das Auftreten von Ca^{2+} -Oszillationen im Einzelexperiment in Pankreasinseln, die mit Hilfe des Collagenase-Digestionsverfahrens nach Gotoh et al. (1985) gewonnen wurden, seltener war.

5.1.2 Der mögliche Beitrag von Nicht-B-Zellen zum Fura-Signal in intakten Pankreasinseln

Die Hormonsekretion von Nicht-B-Zellen in einer Langerhans'schen Insel wird z. T. ebenfalls über einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ vermittelt (Gromada et al., 1997). Es stellen sich demnach zwei Fragen: 1.) Wie wahrscheinlich ist eine solche in Nicht-B-Zellen induzierte Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ während Umströmungen von Pankreasinseln mit Glucose-haltigem Basismedium oder mit K_{ATP} -Kanalblockern wie dem Tolbutamid? 2.) Kann eine solche Änderung die Interpretation der Messergebnisse beeinträchtigen?

In einigen Untersuchungen wurde postuliert, dass auch die Somatostatin-Freisetzung aus D-Zellen durch K_{ATP} -Kanäle reguliert werden kann (Berts et al., 1996; Quesada et al., 1999). Wie in B-Zellen wird auch in D-Zellen durch Tolbutamid und Glucose ein Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst. Dabei führt eine Erhöhung der Glucosekonzentration zu asynchronen Ca^{2+} -Oszillationen, die sich nicht über die Langerhans'sche Insel ausbreiten (Berts et al., 1996; Nadal et al., 1999; Quesada et al., 1999), wohingegen in Abwesenheit von Glucose ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ vollständig ausbleibt (Nadal et al., 1999). Es wären demnach ein $[Ca^{2+}]_i$ -Signal und die Induktion asynchroner Ca^{2+} -Oszillationen in Gegenwart von Glucose und K_{ATP} -Kanalblockern wie Tolbutamid nicht ganz auszuschliessen. Da aber 1.) das oszillatorische Muster der B-Zellen nicht asynchron, sondern typischerweise synchron verläuft (Nadal et al., 1999) und ein synchrones oszillatorisches Muster in den meisten experimentellen Befunden nachgewiesen werden konnte (u.a. Abb. 4.2. und Abb. 4.4.), wobei einzelne asynchrone Verläufe mit grosser Wahrscheinlichkeit auf eine Beeinträchtigung der funktionellen Integrität der umströmten Pankreasinseln zurückzuführen waren, und 2.) der Anteil der D-Zellen an der gesamten Zellpopulation in der Pankreasinsel gering ist (ca. 3 - 10 %), ist eine Beeinträchtigung der Messergebnisse durch ein $[Ca^{2+}]_i$ -Signal in D-Zellen von geringer Wahrscheinlichkeit.

Der Anteil der A-Zellen an der Gesamtheit der endokrinen Zellen in der Pankreasinsel liegt hingegen bei ca. 15 %. Da die A-Zellen zudem überwiegend in der Peripherie der Pankreasinsel lokalisiert sind, wäre eine mögliche Beeinträchtigung des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals von wesentlich grösserer Bedeutung. Es konnte aber festgestellt werden, dass A-Zellen nur in geringem Ausmass K_{ATP} -Kanäle besitzen (Berts et al., 1996; Quesada et al., 1999), so dass K_{ATP} -Kanalblocker wie Tolbutamid die Glucagon-Freisetzung nicht auslösen können (Gregorio et al., 1992). Auch durch Glucose konnten keine cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen in A-Zellen induziert werden (Nadal et al., 1999). Lediglich in Abwesenheit von Glucose wurde ein

oszillatorisches Muster beobachtet (Gromada et al., 1997). Da aber unsere experimentellen Befunde belegen, dass durch substimulatorische Glucosekonzentrationen (5 mM) kein oszillatorisches Muster in den umströmten Pankreasinseln induziert werden konnte (u.a. Abb. 4.4.), kann davon ausgegangen werden, dass unter unseren gewählten experimentellen Bedingungen der Beitrag der A-Zellen zum gesamten $[Ca^{2+}]_i$ -Signal der Pankreasinseln als vernachlässigbar gering einzuschätzen ist.

5.2 Untersuchungen zum Antagonismus der insulinotropen Wirkung von Imidazolinen durch den K_{ATP} -Kanalöffner Diazoxid

Es ist bekannt, dass die insulinotrope Wirkung der Imidazoline u.a. auf der Blockade des K_{ATP} -Kanals beruht, insbesondere durch Bindung an die kanalporenformende Untereinheit Kir6.2 (Rustenbeck et al., 1997b). Diese Eigenschaft ist insofern problematisch, als Kir6.2 in vielen Geweben exprimiert wird, und es unklar ist, ob die durch Imidazoline gehemmten K_{ATP} -Kanäle noch durch pharmakologische Öffner beeinflusst werden können. Deshalb wurde geprüft, ob ein Öffner des K_{ATP} -Kanals wie Diazoxid die insulinotrope Wirkung der Imidazoline aufzuheben vermag. Bisher ist nachgewiesen worden, dass eine K_{ATP} -Kanalblockade induziert durch Phentolamin nicht vollständig durch Diazoxid antagonisiert werden konnte (Plant und Henquin, 1990; Plant et al., 1991), wohingegen eine durch Diazoxid gehemmte Insulinsekretion durch Imidazoline wieder gesteigert werden konnte (Chan et al., 1991). Die in dieser Arbeit präsentierten experimentellen Befunde sollten Aufschluss darüber geben, ob der Antagonismus bezüglich der Insulinsekretion wechselseitig ist. Als Vergleichssubstanzen wurden Tolbutamid und Chinin gewählt: Tolbutamid schliesst den K_{ATP} -Kanal durch Bindung an die SUR1-Untereinheit, in Konzentrationen über 500 μ M übt es auch einen direkten Effekt auf die porenformende Untereinheit Kir6.2 aus (Ashcroft und Gribble, 1999), Chinin stimuliert die Insulinsekretion durch Hemmung der K_{ATP} -Kanalaktivität (Henquin, 1982; Bokvist et al., 1990) und übt gleichermassen wie die Imidazoline einen Effekt auf die porenformende Untereinheit Kir6.2 aus (Gribble et al., 2000; Grosse Lackmann et al., 2003).

Wie im Ergebnisteil dargestellt (s. Kapitel 4.2.1.) ist der Antagonismus bezüglich der Insulinsekretion prinzipiell wechselseitig darstellbar. Da diese experimentellen Befunde mit den Effekten von Diazoxid auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration korrespondieren (Rustenbeck et al., 1999b), beschränkt sich der Antagonismus nicht nur auf den K_{ATP} -Kanal, sondern kann durch alle Stadien der Stimulus-Sekretions-Kopplung hinweg beobachtet werden.

Die Beobachtung, dass der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und der Insulinsekretion induziert durch das Imidazolin Phentolamin und das Chinolinalkaloid Chinin durch Diazoxid nicht antagonisiert werden konnte, wohl aber die durch diese Substanzen bewirkte Depolarisation (Grosse Lackmann und Rustenbeck, unveröffentlichte Beobachtungen), ist am ehesten auf die unterschiedlichen Versuchsbedingungen zurückzuführen: Das Membranpotential wurde in der whole-cell-Konfiguration gemessen, in der das Cytosol durch die Pipettenlösung ausgewaschen wird (Marty und Neher, 1983), die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration und die Insulinsekretion hingegen an intakten Pankreasinseln. Denkbar ist, dass Phentolamin und Chinin in intakten Zellen in einem gewissen Grad akkumulieren, so dass ihre Effekte am Kir6.2 durch Diazoxid in der angegebenen Konzentration nicht mehr antagonisiert werden können und damit der ausbleibende Antagonismus ein pharmakokinetischer Effekt ist.

5.3 Bedeutung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration für den insulinotropen Effekt von Imidazolin

Der β -zytrotrope Effekt einiger Imidazoline ist für die Entwicklung oraler Antidiabetika von besonderem Interesse, da diese Imidazoline - insbesondere Efaroxan - die Insulinsekretion Glucose-selektiv, d.h. nur in Gegenwart erhöhter Glucosekonzentration steigern (Chan und Morgan, 1990; Rustenbeck et al., 1999b), aber nicht - wie in Abbildung 5.1. dargestellt - in Gegenwart basaler Glucosekonzentration, obgleich Efaroxan den K_{ATP} -Kanal nahezu vollständig blockiert (Bleck et al., 2004). Interessanterweise stieg auch die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration durch 100 μM Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose deutlich an (Abb. 5.1.), wobei im Einzelexperiment auch ein oszillatorisches Muster beobachtet werden konnte (Abb. 4.21.B.). Des weiteren konnte dasselbe Phänomen auch bei dem Imidazolin Alindin beobachtet werden (Abb. 5.2.). Diese resultierende Diskrepanz zwischen dem Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einerseits und dem Ausbleiben der Stimulation der Insulinsekretion andererseits (Abb. 5.1. und Abb. 5.2.) lässt sich nicht ohne weiteres erklären über die allgemein anerkannte - als Konsensushypothese bezeichnete - Vorstellung vom Ablauf der Stimulus-Sekretions-Kopplung der Insulinsekretion in B-Zellen des Pankreas (Rustenbeck, 1999a), da hierin der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ das unmittelbar auslösende Signal für die Insulinsekretion darstellt.

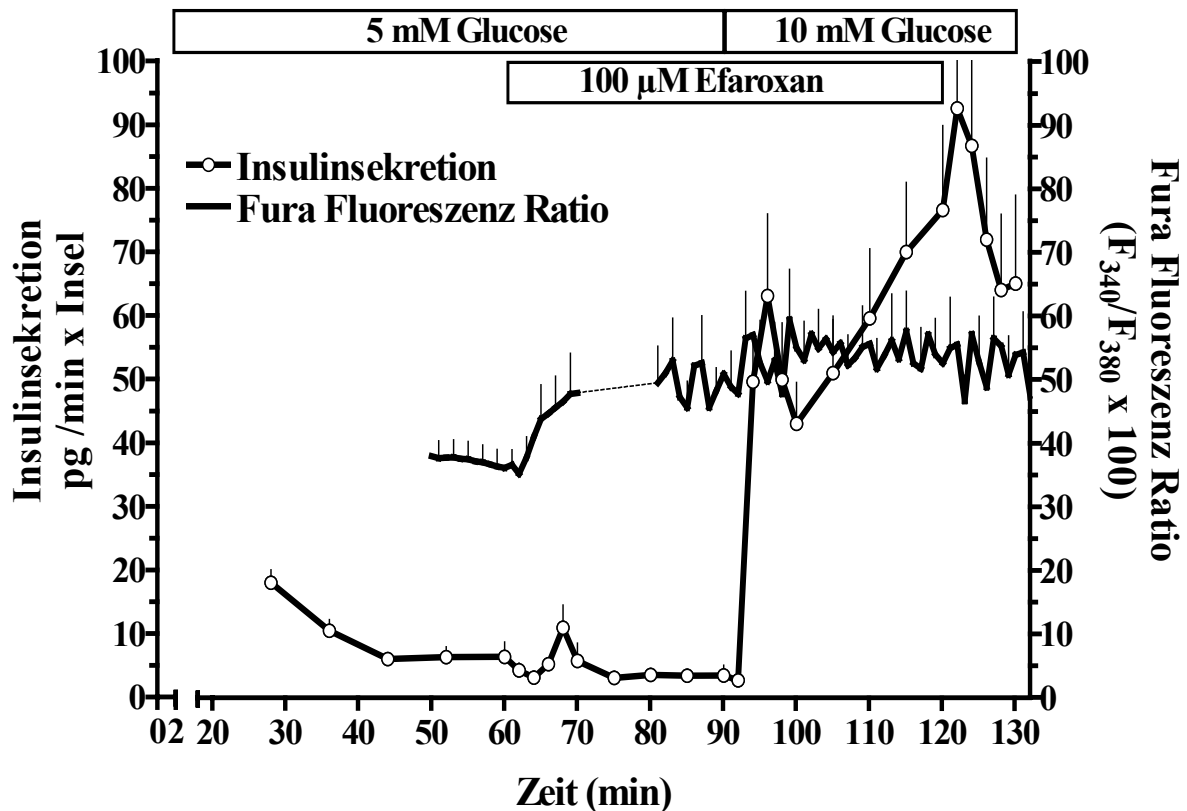


Abb. 5.1.: Der Efaroxan-induzierte Effekt auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich mit der Efaroxan-induzierten Stimulation der Insulinsekretion. Pankreasinseln der Maus wurden mit einer KR-Lösung umströmt, die 5 mM Glucose enthielt. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Bei beiden Messungen wurden dem Medium ab Minute 60 100 μ M Efaroxan zugesetzt. Aus messtechnischen Gründen dauerte bei den Fluoreszenzmessungen die Umströmung mit Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose nur 20 Minuten. Um eine synchrone Darstellung des Wechsels auf 10 mM Glucose zu erreichen, wurde im „steady state“ der Fura-Fluoreszenz ein 10minütiges Intervall (gepunktete Linie) eingefügt. Dargestellt ist 1.) die Insulinsekretion von jeweils 50 Pankreasinseln der Maus in pg/min x Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten, wobei der Mittelwert \pm SEM aus 4 Umströmungen erstellt wurde und 2.) die Fura-Fluoreszenz-Ratio von jeweils einer Pankreasinsel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Dieser Mittelwert \pm SEM resultierte aus 6 Umströmungen.

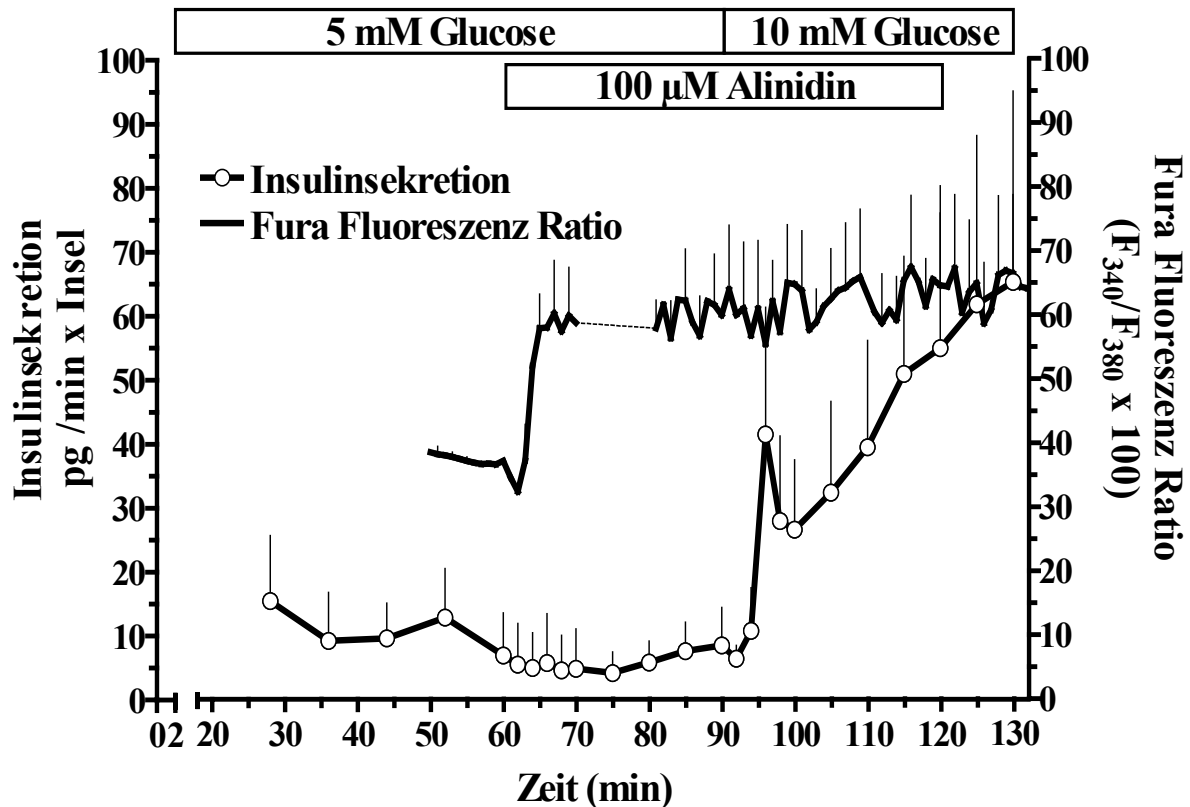
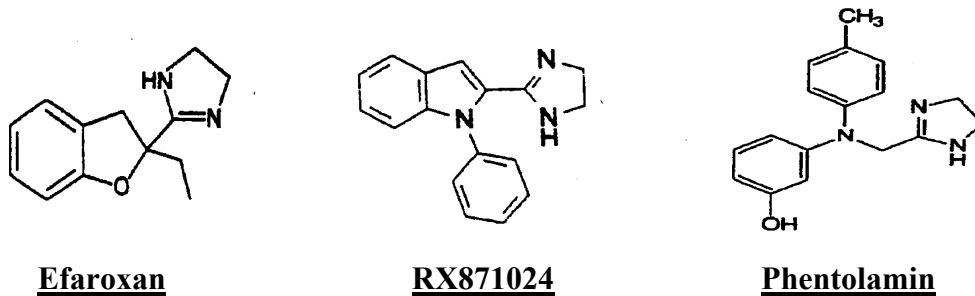


Abb. 5.2.: Der Alinidin-induzierte Effekt auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration im Vergleich mit der Alinidin-induzierten Stimulation der Insulinsekretion. Pankreasinseln der Maus wurden mit einer KR-Lösung umströmt, die 5 mM Glucose enthielt. Zum angegebenen Zeitpunkt wurde die Glucosekonzentration auf 10 mM erhöht. Bei beiden Messungen wurden dem Medium ab Minute 60 100 μM Alinidin zugesetzt. Aus messtechnischen Gründen dauerte bei den Fluoreszenzmessungen die Umströmung mit Alinidin in Gegenwart von 5 mM Glucose nur 20 Minuten. Um eine synchrone Darstellung des Wechsels auf 10 mM Glucose zu erreichen, wurde im „steady state“ der Fura-Fluoreszenz ein 10minütiges Intervall (gepunktete Linie) eingefügt. Dargestellt ist 1.) die Insulinsekretion von jeweils 50 Pankreasinseln der Maus in $\text{pg/min} \times \text{Insel}$ in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten, wobei der Mittelwert \pm SEM aus 4 Umströmungen erstellt wurde und 2.) die Fura-Fluoreszenz-Ratio von jeweils einer Pankreasinsel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Dieser Mittelwert \pm SEM resultierte aus 4 Umströmungen.

Es stellt sich somit die Frage, warum ein solches $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signal nicht zu einer Stimulation der Insulinsekretion führt, obwohl 1.) dieser Anstieg in der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ähnlich stark ist wie derjenige verursacht durch eine K^+ -Depolarisation, der bekanntermaßen dafür hinreichend ist (vgl. Abb. 4.21.) und 2.) ein Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als direkter Auslöser der Insulinsekretion aufgefasst wird (Rustenbeck, 1999a; Ravier et al., 1999; Barg, 2003). Um die Bedeutung des Ca^{2+} -Signals für die Imidazolin-induzierte Insulinsekretion zu erfassen, wurden die Effekte ausgewählter Modellschubstanzen aus der Substanzgruppe der Imidazoline (RX871024, Phentolamin, Alinidin) auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ untersucht und mit denjenigen induziert von Efaroxan verglichen.

5.3.1 Die unterschiedliche Glucoseselektivität der insulinotropen Wirkung der vier Imidazoline Efaroxan, Alinidin, RX871024 und Phentolamin



Die drei ausgewählten Modellschubstanzen stimulieren die Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM und 10 mM Glucose unterschiedlich: 100 μ M Alinidin (Abb. 5.2.) und RX871024 in einer Konzentration von 10 - 50 μ M (Zaitsev et al., 1996; Efanov et al., 2002) stimulieren die Insulinsekretion erst in Gegenwart von 10 mM Glucose, wohingegen die Insulinsekretion durch 100 μ M RX871024 (Abb. 5.3.) und 100 μ M Phentolamin (Bleck et al., 2004) bereits bei 5 mM Glucose stimuliert wird.

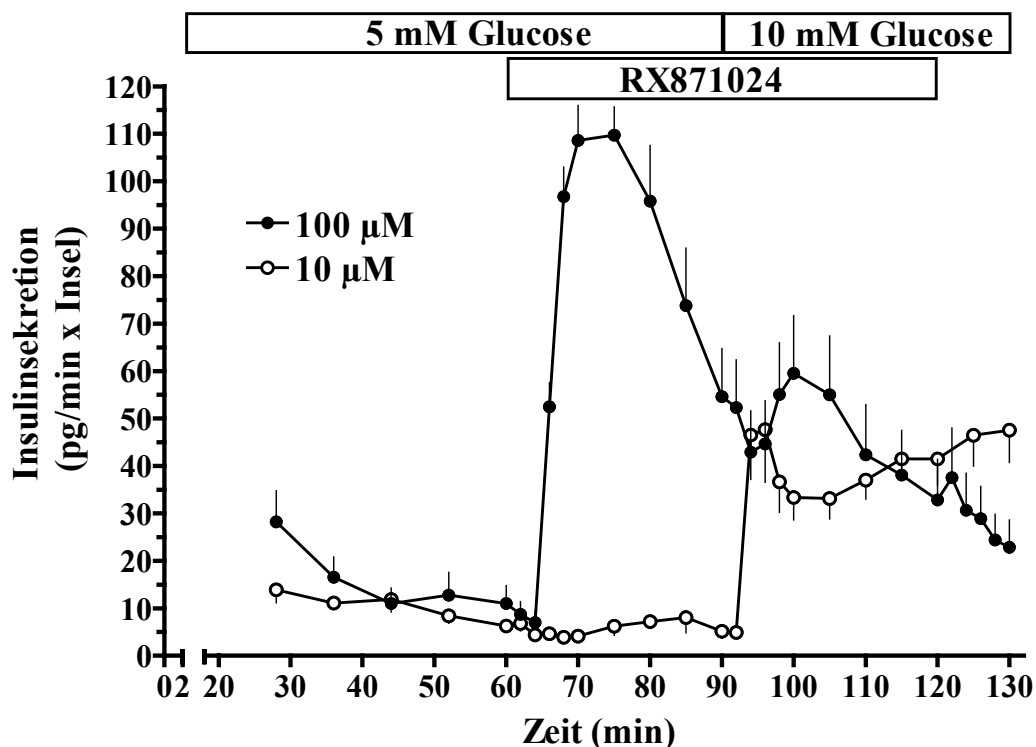


Abb. 5.3.: Die durch 100 μ M und 10 μ M RX871024 induzierte Stimulation der Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose. Pankreasinseln der Maus wurden von Minute 0-90 mit einer KR-Lösung umströmt, die 5 mM Glucose enthielt. Ab Minute 60 wurde diesem Medium 100 μ M bzw. 10 μ M RX871024 zugesetzt. Die Glucosekonzentration wurde ab Minute 90 - bei fortdauernder Anwesenheit von 100 μ M bzw. 10 μ M RX871024 - auf 10 mM erhöht (Minute 90-130). Dargestellt ist die Insulinsekretion in pg/min x Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist jeweils der Mittelwert \pm SEM (n=4).

Die gezeigte Glucoseselektivität ist zudem konzentrationsabhängig: 10 μM RX871024 stimulieren die Insulinsekretion erst in Gegenwart von 10 mM Glucose (Abb. 5.3.), 500 μM Efaroxan hingegen bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose (Abb. 5.4.).

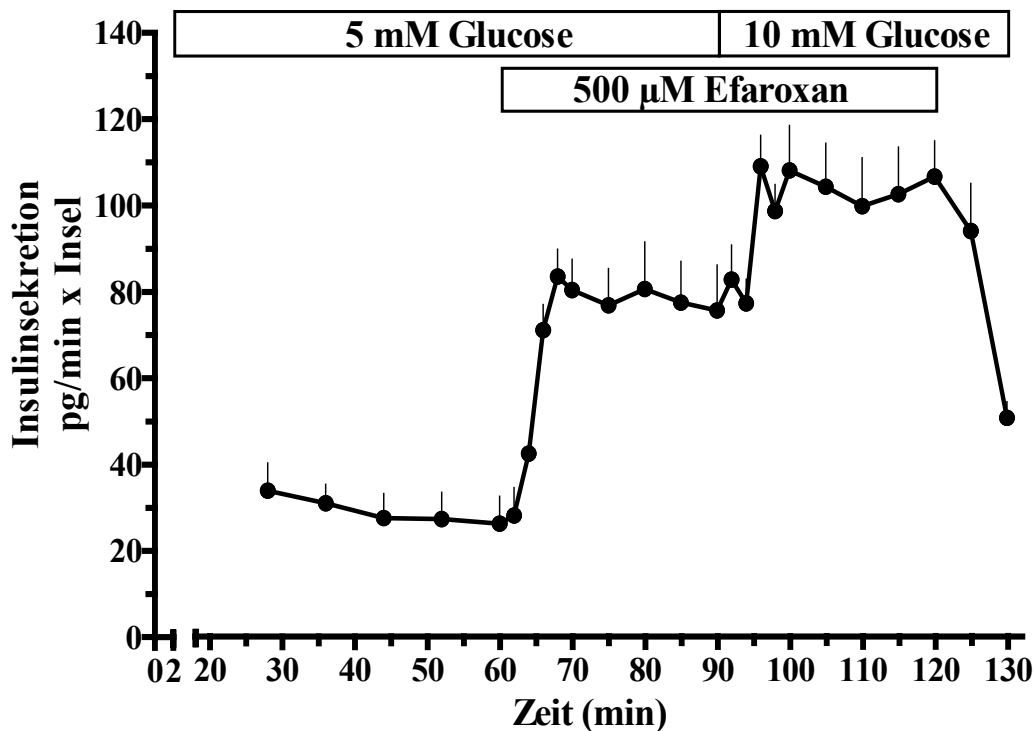


Abb. 5.4.: Die durch 500 μM Efaroxan induzierte Stimulation der Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose. Pankreasinseln der Maus wurden von Minute 0 bis 90 mit einer KR-Lösung umströmt, die 5 mM Glucose enthielt. Ab Minute 60 wurde diesem Medium 500 μM Efaroxan zugesetzt (bis Minute 120). Die Glucosekonzentration wurde von Minute 90 bis 130 auf 10 mM erhöht. Dargestellt ist die Insulinsekretion in pg/min x Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM ($n=4$).

Zaitsev et al. postulierten bereits 1996 als zusätzliche K_{ATP} -Kanal-unabhängige Imidazolin-spezifische Wirkung von RX871024 - basierend auf experimentelle Untersuchungen an permeabilisierten Zellen bei fixierter Ca^{2+} -Konzentration - eine Aktivierung exozytosenaher Prozesse, wodurch $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ -Signale dann effektiver eine Sekretionssteigerung auslösen könnten. Von Chan et al. wurde ein solcher Mechanismus auch für Efaroxan behauptet (Chan et al., 2001a).

Allgemein akzeptiert ist, dass eine hochgradige Blockade des K_{ATP} -Kanals (Ashcroft und Ashcroft, 1990; Panten et al., 1992) mit einer darauf folgenden Depolarisation der Plasmamembran der B-Zellen der Maus (Rustenbeck et al., 1998) eine Stimulation der Insulinsekretion auch bei sehr geringen Glucosekonzentrationen hervorruft (Sturgess et al., 1985; Panten et al., 1992). Auch alle vier untersuchten Imidazoline Efaroxan, RX871024, Alinidin und Phentolamin blockieren den K_{ATP} -Kanal vollständig und bewirken eine vollständige

Depolarisation der Plasmamembran (Rustenbeck et al., 1997a; Zaitsev et al., 1999; Bleck et al., 2004). Dennoch wird die Insulinsekretion durch 100 μM Efaroxan, 100 μM Alindin und 10 μM RX871024 Glucose-selektiv gesteigert. Eine K_{ATP} -Kanalblockade scheint demnach nicht unvereinbar zu sein mit einer Glucose-selektiven Verstärkung der Insulinsekretion.

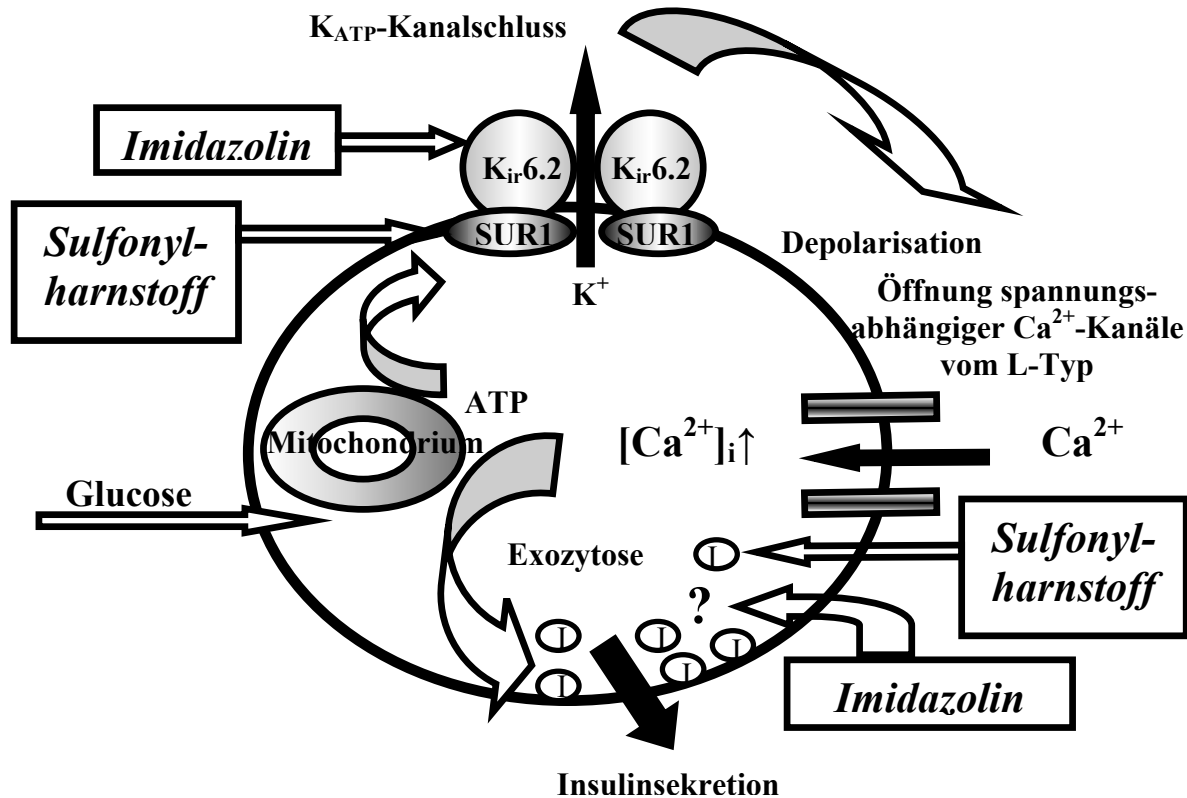


Abb. 5.5.: Die Stimulation der Insulinsekretion in einer pankreatischen B-Zelle. Durch die Verstoffwechselung von Glucose kommt es zum Anstieg der ATP-Konzentration und Abfall der ADP-Konzentration in der B-Zelle. ATP blockiert den K_{ATP} -Kanal durch Bindung an $K_{\text{ir}}6.2$, ADP öffnet diesen Kanal durch Bindung an SUR1 . Die Imidazoline aber binden vermutlich an der porenformenden K_{ATP} -Kanaluntereinheit $K_{\text{ir}}6.2$. Die Blockade des K_{ATP} -Kanals führt zur Depolarisation der Plasmamembran und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle vom L-Typ. Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration steigt durch den Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen an, was die Auslösung der Exozytose der Insulingranula zur Folge hat und damit die Freisetzung des Insulins aus der B-Zelle. Noch nicht geklärt ist der Mechanismus der Verstärkung der Insulinfreisetzung, der „amplifying pathway“.

Unsere Umströmungen zur Untersuchung der Änderung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals haben ergeben, dass nur die nicht Glucose-selektiven Sekretionsanstiege induziert durch 100 μM RX871024 (Abb. 5.3.) und 100 μM Phentolamin (Bleck et al., 2004) mit den nicht Glucose-selektiven und nicht oszillatorischen Anstiegen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 4.30. bzw. 4.31. und Abb. 4.27.) korrelieren, wohingegen sich bei 100 μM Efaroxan, 100 μM Alinidin und 10 μM RX871024 die bereits erwähnte Diskrepanz zwischen dem oszillatorischen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Abb. 4.21.; Abb. 4.28.; Abb. 4.29.) und dem

Ausbleiben der sekretorischen Antwort bei 5 mM Glucose ergibt (Abb. 5.1.; Abb. 5.2.; Abb. 5.3.). Eine Glucose-unabhängige Aktivierung exozytosenaher Prozesse kann damit nicht die Glucoseselektivität des insulinsekretionssteigernden Effektes von Efaroxan erklären (Abb. 5.1.). Vielmehr lassen die Untersuchungen die Schlussfolgerung zu, dass die Induktion cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen einen Beitrag zur Glucose-selektiven Insulinfreisetzung leisten könnten.

5.3.2 Ist die Glucoseselektivität des insulinotropen Effekts von Efaroxan Teil einer Selektivität für sekretionsauslösende Nährstoffe ?

Um die mögliche Ursache der Glucoseselektivität einzuengen, wurde der Effekt von 100 μM Efaroxan auf die Insulinsekretion in Gegenwart von KIC und Glutamin untersucht (s. Abb. 5.6.).

Es ist bekannt, dass KIC, das Transaminierungsprodukt von Leucin (Panten et al., 1972), auch in Abwesenheit anderer Nährstoffe eine schnelle, anhaltende und starke Insulinsekretion in Langerhans'schen Inseln stimuliert (Panten, 1975). Wie Glucose gehört KIC damit zu den Initiatoren der Insulinsekretion mit Nährstoffcharakter. Über den intramitochondrialen Stoffwechsel von KIC kommt es zur Erhöhung der ATP-Produktion und damit über die Blockade des K_{ATP} -Kanals zur Auslösung der Insulinsekretion (Ashcroft et al., 1987). Dieser hemmende Effekt von KIC ist konzentrationsabhängig (Schmeling, 2004; Heissig et al., 2005). Es wurde aber auch beschrieben, dass KIC unabhängig von seiner Wirkung auf den Energiestoffwechsel den K_{ATP} -Kanal schliesst. In neueren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Panten wurde belegt, dass dies jedoch nur bei hohen Konzentrationen von KIC im millimolaren Bereich zum tragen kommt (Heissig et al., 2005). In Konzentrationsbereichen bis 10 mM kann KIC damit weiterhin als experimentelles Werkzeug zur Nährstoff-induzierten Insulinsekretion dienen.

Bei den Experimenten wurden die Pankreasinseln während der gesamten Expositionsphase zusätzlich zu KIC mit Glutamin umströmt, um die vollständige Verstoffwechselung von KIC zu gewährleisten (Hastedt, 2003). Glutamin, das die Plasmamembran der B-Zelle im Gegensatz zu Glutamat passieren kann, wird intrazellulär durch die Glutaminase zu Glutamat desaminiert. KIC wird in der B-Zelle unter Verbrauch von Glutamat metabolisiert, die Konzentration an Glutamat stellt demnach einen limitierenden Faktor für die Verstoffwechselung von KIC dar (Sener und Malaisse, 1980, Panten und Langer, 1981; Lenzen et al., 1986).

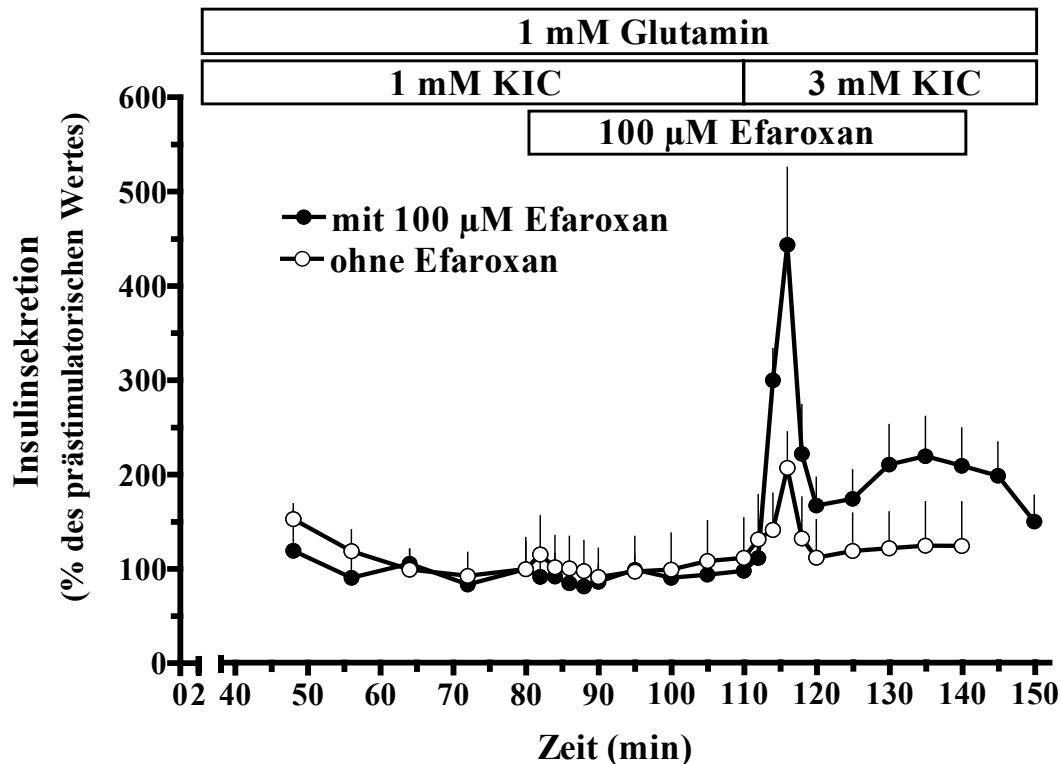


Abb. 5.6.: Der Efaroxan-induzierte Effekt auf die Insulinsekretion in Gegenwart von α -Ketoisocaproensäure (KIC). Frisch isolierte Pankreasinseln der Maus wurden während der gesamten Expositionsphase (Minute 0 bis 150) mit KR-Medium, das 1 mM Glutamin enthielt, umströmt. Minute 0 bis 110 wurde diesem Medium 1 mM KIC zugesetzt. Ab Minute 80 begann die Exposition mit 100 µM Efaroxan (Minute 80 bis 140). Bei fortdauernder Anwesenheit von 100 µM Efaroxan wurde in der Minute 110 die KIC-Konzentration auf 3 mM erhöht. Dargestellt ist die Insulinsekretion in Prozent in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist ein Mittelwert \pm SEM ($n=3$). Die Sekretionsrate der letzten Fraktion vor dem Umschalten auf das Testmedium (Minute 80) wurde auf 100 % gesetzt. Zur Kontrolle erfolgte das gleiche experimentelle Protokoll ohne die Testsubstanz Efaroxan.

Wie in Abbildung 5.6. belegt konnte die Insulinsekretion in Gegenwart von 1 mM KIC durch 100 µM Efaroxan nicht stimuliert werden, nach Erhöhung der KIC-Konzentration auf 3 mM konnte hingegen ein biphasischer Sekretionsanstieg verzeichnet werden. Die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Langerhans'schen Inseln stieg hingegen durch 100 µM Efaroxan unabhängig von der KIC-Konzentration an (Abb. 4.25.).

Diese Experimente belegen, dass die in Gegenwart von Glucose und Efaroxan zu beobachtene Diskrepanz zwischen dem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dem Ausbleiben der Insulinsekretion (Abb. 4.21. und Abb. 5.1.) auch in Gegenwart von KIC und Glutamin zu beobachten sind (Abb. 4.25. und Abb. 5.6.). In weiteren Entsprechungen der mit Glucose erhobenen Befunden war ein deutlich verstärkender Effekt zu verzeichnen, sobald die KIC-Konzentration von sich aus stimulatorisch war. Damit hat sich herausgestellt, dass der insulinotrope Effekt des Efaroxans nicht Glucose-spezifisch, sondern stoffwechselabhängig ist.

5.3.3 Über welchen Mechanismus ist der Efaroxan-induzierte Effekt in Gegenwart substimulatorischer Glucosekonzentration (5 mM) zu begründen ?

Es stellt sich die Frage, welcher Mechanismus der Diskrepanz zwischen dem $[Ca^{2+}]_i$ -Signal und dem Ausbleiben der Insulinsekretion zugrunde liegt. Drei grundsätzliche Möglichkeiten sind in Betracht zu ziehen: 1.) Eine inhibitorische Wirkung auf die Insulinsekretion distal des Ca^{2+} -Einstroms, 2.) ein verändertes zeitliches Muster im Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ oder 3.) räumliche Unterschiede im Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$.

Eine etablierte Möglichkeit der Hemmung der Insulinsekretion distal des Ca^{2+} -Einstroms ist diejenige über den Energiestoffwechsel. Es gibt Substanzen wie z.B. CCCP, die in der Lage sind, die oxidative Phosphorylierung zu hemmen, einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ zu induzieren, dabei aber keine Insulinsekretion auszulösen (Rustenbeck et al., 1997a). Es stellte sich die Frage, ob Efaroxan auch so reagiert. Die Befunde belegen, dass i.) kein Einbruch der NAD(P)H-Konzentration durch Efaroxan verursacht wird (Abb. 4.53.) und ii.) bei fort-dauernder Anwesenheit von Efaroxan nach Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM ein biphasischer Sekretionsanstieg beobachtet werden kann (Abb. 5.1.), der zehnmal höher ist als unter Kontrollbedingungen (Bleck et al., 2004). Ein solch erheblicher Sekretionsanstieg dürfte nicht mit einer fortdauernden Hemmung des Energiestoffwechsels vereinbar sein (Bleck et al., 2004).

Denkbar ist aber auch, dass die fehlende Stimulation der Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose trotz hinreichendem $[Ca^{2+}]_i$ -Signal dadurch entsteht, dass Efaroxan im Bereich distal des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals inhibitorisch wirkt, möglicherweise im Bereich des funktionellen „crosstalks“ zwischen L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und exozytotischen Proteinen (z.B. SNAP25, Synaptotagmin oder Syntaxin; Barg, 2003). Bekannt ist, dass α_2 -Agonisten wie Adrenalin und Clonidin auch distal des Ca^{2+} -Einstroms ihren Angriffsort besitzen (Ullrich und Wollheim, 1984), wobei die Hemmwirkung dabei vermutlich über einen G-Protein-gekoppelten Mechanismus läuft, bestehend aus einer Absenkung der cAMP-Konzentration und damit einer fehlenden Aktivierung der Proteinkinase A oder - auch denkbar - der EPAC-Funktion (s. unten). Da es sich bei den Imidazolininen wie Clonidin um α_2 -Agonisten handelt (Broadstone et al., 1987; Morgan et al., 1994), wäre ein Agonismus dieser Substanzen nicht auszuschliessen. Allerdings ist ein solcher Agonismus für die in dieser Arbeit im Mittelpunkt stehenden Substanzen nicht ermittelt wurden.

Von besondere Bedeutung an den Befunden ist aber zweifellos das zeitliche Muster des Anstiegs der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Da das Ausbleiben der Stimulation der

Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose durch 100 μ M Efaroxan, 10 μ M RX871024 und 100 μ M Alinidin immer dann zu beobachten ist, wenn sich im $[Ca^{2+}]_i$ -Signal ein oszillatorisches Muster abzeichnet, wohingegen sich bei einer nicht Glucose-selektiven Konzentration (500 μ M Efaroxan, 100 μ M RX871024 und 100 μ M Phentolamin) nur langanhaltende $[Ca^{2+}]_i$ -Signale ohne oszillatorisches Muster entwickeln, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Induktion cytosolischer Ca^{2+} -Oszillationen in Gegenwart von 5 mM Glucose durch Efaroxan, Alinidin und RX871024 zur Glucoseselektivität im Sekretionsverhalten beiträgt und möglicherweise für das Ausbleiben der Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose mitverantwortlich ist. Auch der Befund, dass die durch 100 μ M Alinidin induzierten cytosolischen Ca^{2+} -Oszillationen den Efaroxan-induzierten insofern entsprechen als sie die gleiche Frequenz aufweisen (Abb. 4.21. und Abb. 4.28.), ist ein weiteres Indiz für diese Vermutung. In diesem Zusammenhang ist auch von Bedeutung, dass Efaroxan auch in Gegenwart von KIC und Glutamin Oszillationen induziert (Abb. 4.25.). Diese unterscheiden sich nicht von denen in Gegenwart von Glucose ausgelösten Oszillationen. Auch diese Oszillationen lösen erst die Insulinsekretion aus, wenn die Nährstoffkonzentration über einen Grenzwert ansteigt (Abb. 5.6.). Von Glucose ist bekannt, dass die Glucose-induzierten Oszillationen in der Glykolyse entstehen (Kennedy et al., 2002; Porksen et al., 2002), bei KIC ist dies jedoch umstritten (Lenzen et al., 2000). Insofern ist die Ursache der Efaroxan-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen noch ungeklärt. Denkbar ist, dass Efaroxan und ähnlich wirksame Substanzen wie Alinidin das oszillatorische Muster induzieren, indem sie den K_{ATP} -Kanalschluss nur teilweise bewirken, so dass unterschwellige Oszillationen der Kanalaktivität überschwellig werden. Das eine solche globale Erklärung nicht hinreichend ist, wird durch die Experimente mit Tolbutamid deutlich (Abb. 4.36. und Abb. 4.37.). Es konnte mit den Befunden aus dieser Versuchsreihe belegt werden, dass Tolbutamid auch bei unvollständigem K_{ATP} -Kanalschluss in der Lage ist, vorwiegend eine dauerhafte Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zu bewirken. Auch die Arbeitsgruppe von Lenzen konnte bereits im Jahre 2001 ähnliches belegen (Lenzen und Peckmann, 2001). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass möglicherweise die Wechselwirkung von Adeninnukleotiden aus dem Energiestoffwechsel und dem Bindungsverhalten von Imidazolin an der K_{ATP} -Kanaluntereinheit Kir6.2 anders ist als das Bindungsverhalten von Sulfonylharnstoffen (Schulz, 2005).

Alternativ zur Hypothese 2 könnte die Diskrepanz zwischen $[Ca^{2+}]_i$ -Signal und Ausbleiben der Insulinsekretion in Gegenwart von 5 mM Glucose und Efaroxan auch dadurch bedingt sein, dass der Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration nicht an für die Exozytose

kritischen Orten stattfindet. Obgleich sowohl der Ca^{2+} -Anstieg ausgelöst durch eine hohe K^+ -Konzentration als auch derjenige ausgelöst durch Efaroxan auf prinzipiell gleiche Weise erfolgt, d. h. auch Folge einer vollständigen Depolarisation der Plasmamembran ist (Bleck et al., 2005), belegt der Befund in Abbildung 4.39., dass trotzdem Ortsunterschiede vorhanden sind. Es ist denkbar, dass der Efaroxan-induzierte Einstrom extrazellulärer Ca^{2+} -Ionen durch andere Ca^{2+} -Kanäle vermittelt werden kann als derjenige einer hohen K^+ -Konzentration, beispielsweise durch spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle vom R-Typ ($\text{Ca}_v2.3$ -Kanäle; Mears, 2004; Yang und Berggren, 2005; Jing et al., 2005). Eine fehlende Kolo-kalisation dieser spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle mit Insulingranula könnte dann zur Hemmung der Insulinsekretion beitragen (Yang und Berggren, 2005). Leider ist eine differenzierte Lokalisierung der intrazellulären Ca^{2+} -Erhöhung mittels des Fura-Signals nicht möglich, so dass zur genaueren Untersuchung dieser Hypothese der Einsatz spezifischer Inhibitoren der R-Typ- Ca^{2+} -Kanäle sinnvoll ist.

In dem gleichen Experiment (Abb. 4.39.) ergibt sich ein Hinweis auf einen weiteren Unterschied. Die initial überschüssige Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch eine hohe K^+ -Konzentration in Anwesenheit von $100\text{ }\mu\text{M}$ Efaroxan kann auch einer atypischen Mobilisation aus internen Ca^{2+} -Speichern zugeschrieben werden. Dieses Konzept ist insofern interessant, da es den Befunden zufolge denkbar wäre, dass eine Freisetzung aus internen Ca^{2+} -Speichern (Bertram und Sherman, 2004; Beauvois et al., 2004; Dyachok und Gylfe, 2004) relevant sein könnte für die Freisetzung von Insulin. In diesem Zusammenhang könnte von Bedeutung sein, dass sich das Sekretionsverhalten von Efaroxan demjenigen von GLP-1 ähnelt, d.h. beide Substanzen die Insulinsekretion Glucose-selektiv steigern. Diese Ähnlichkeiten im Sekretionsverhalten könnten Folge von Ähnlichkeiten im dazugehörigen Mechanismus sein. So wäre es denkbar, dass Efaroxan - ähnlich wie GLP-1 - die Entstehung von cAMP verhindern kann, so dass die Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern vermittelt über eine cAMP-abhängige Aktivierung der Proteinkinase A (Gromada et al., 2004; Beauvois et al., 2004) oder - wie bei GLP-1 - über eine cAMP-abhängige Aktivierung des Proteins EPAC (cAMPGEFs = cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factors; Holz, 2004) ausbleibt.

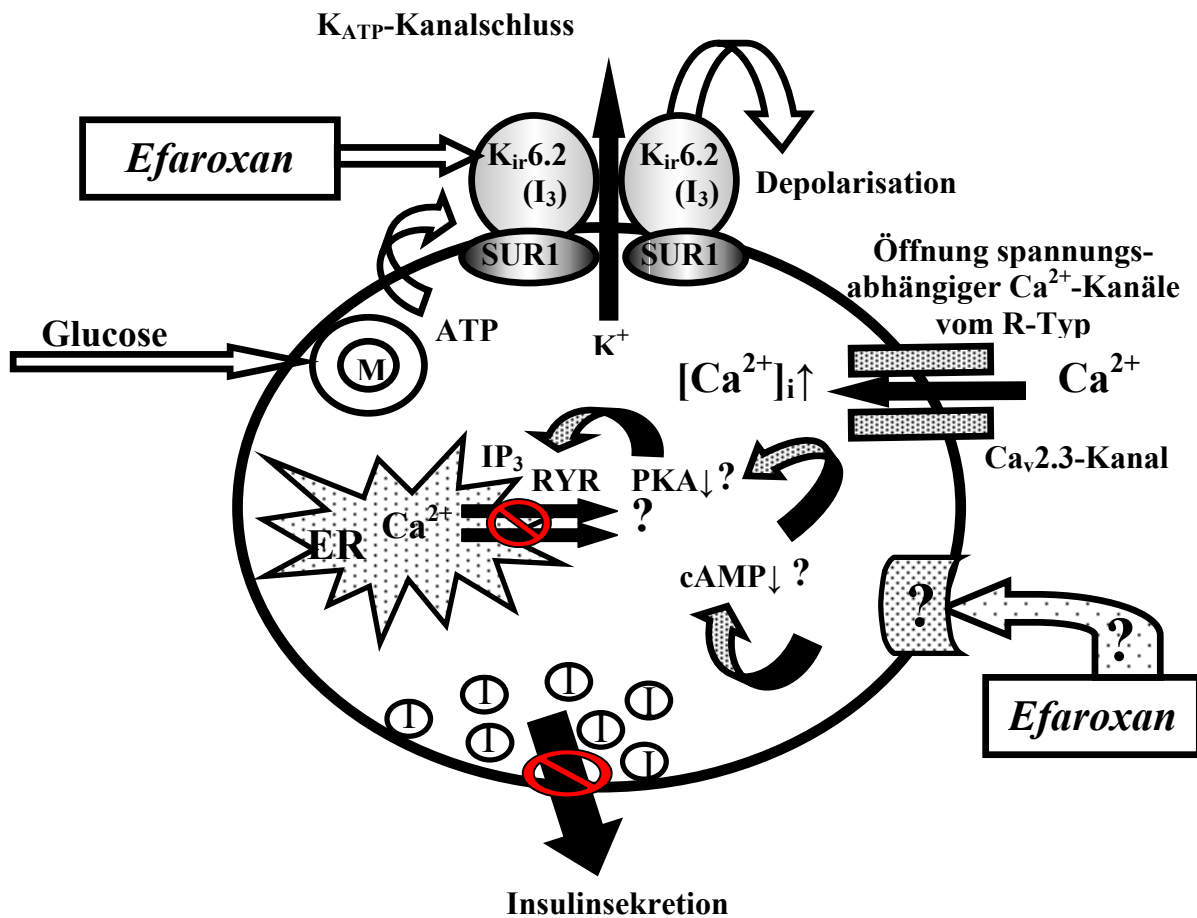


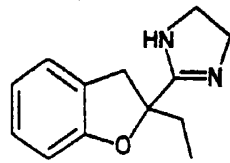
Abb. 5.7.: Möglicher Mechanismus des Imidazolins Efaroxan in der B-Zelle in Gegenwart substimulatorischer Glucosekonzentration (5 mM). Efaroxan blockiert fast vollständig den K_{ATP} -Kanal, es kommt zur Depolarisation der Plasmamembran und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle. Sollten sich vorwiegende Ca^{2+} -Kanäle vom R-Typ öffnen, könnte dies ein Ausbleiben der Insulinsekretion erklären, da sich der Pool der Insulingranula nicht in der Nähe dieser Ca^{2+} -Kanäle befindet. Zusätzlich könnte Efaroxan an einer distalen Stelle exozytosenah eine hemmende Wirkung entfalten. Daten zur Wirkung Efaroxans auf die cAMP-Konzentration sind aber bisher widersprüchlich (Mourtada et al., 1998). Durch eine Reduktion der cAMP-Konzentration würde es zum Ausbleiben der Öffnung von Ryanodinrezeptoren (RYR) und InsP3-Rezeptoren (IP_3) am endoplasmatischen Retikulum (ER) kommen, so dass Ca^{2+} -Ionen aus dem internen Speicher nicht zum $[Ca^{2+}]_i$ -Signal beitragen können. Denkbar ist, dass dieser Beitrag von grösserer Bedeutung für die Auslösung der Insulinsekretion ist als bisher angenommen (Abk.: M=Mitochondrien).

Ob dem second messenger cAMP eine solch wichtige Rolle in der Stimulus-Sekretions-Kopplung zugeschrieben werden kann, muss noch geklärt werden, aber der Befund von Dyachok et al., dass intrazelluläre cAMP-Oszillationen in der B-Zelle existieren, die synchrone cytosolische Ca^{2+} -Oszillationen induzieren können (Dyachok et al., 2006), welche bekanntermassen die pulsatile Insulinfreisetzung zur Folge haben (Ravier et al., 1999; Kjems et al., 2002), ist ein weiteres Indiz dafür, dass cAMP für die Stimulus-Sekretions-Kopplung

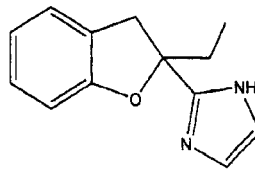
von grösserer Bedeutung sein könnte als bisher angenommen.

Diese Erklärungsmöglichkeiten zeigen, dass die experimentell belegbare Diskrepanz zwischen einem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und dem Ausbleiben der Insulinsekretion aus der Literatur erklärbar und weitgehend vereinbar ist mit der Theorie der Stimulus-Sekretions-Kopplung.

5.4 Das Imidazolin Efaroxan und dessen Imidazol-Analogon KU14R: Unterschiede und Gemeinsamkeiten



Efaroxan



KU14R

KU14R, das Imidazol-Analogon des Efaroxan, wurde als Imidazolinantagonist vorgestellt, da als Mechanismus das Öffnen von Imidazolin-blockierten K_{ATP} -Kanälen beschrieben wurde (Chan et al., 1998). Von anderen Autoren wurden jedoch additive Effekte von beiden Substanzen auf die Insulinsekretion in *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten beschrieben (Ball et al., 2000; Mayer und Taberner, 2002). Untersuchungen der Effekte auf den K_{ATP} -Kanal und das Membranpotential zeigten, dass KU14R ebenso wie Efaroxan den K_{ATP} -Kanal vollständig schliessen und die Plasmamembran depolarisieren kann, allerdings nicht die Insulinsekretion stimulieren kann (Bleck, 2006).

Wie in Abbildung 5.8. dargestellt ergab die Untersuchung des Effektes von KU14R auf die Insulinsekretion in einer den K_{ATP} -Kanal vollständig schliessenden Konzentration (300 μM), dass KU14R keinen verstärkenden Effekt auf die Insulinsekretion hatte, weder bei 5 mM Glucose noch bei 10 mM Glucose. Es stellt sich somit die Frage, wie dieser Widerspruch zwischen einer vollständigen Blockade des K_{ATP} -Kanals und der darauf folgenden vollständigen Depolarisation einerseits und dem Ausbleiben der Insulinsekretion andererseits zu erklären ist.

Wie im Ergebnisteil präsentiert (Abb. 4.40. und Abb. 4.41.) ergaben die Untersuchungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, dass sowohl 100 μM als auch 300 μM KU14R nur einen sehr geringen Ca^{2+} -Anstieg in Gegenwart von Glucose bewirkten.

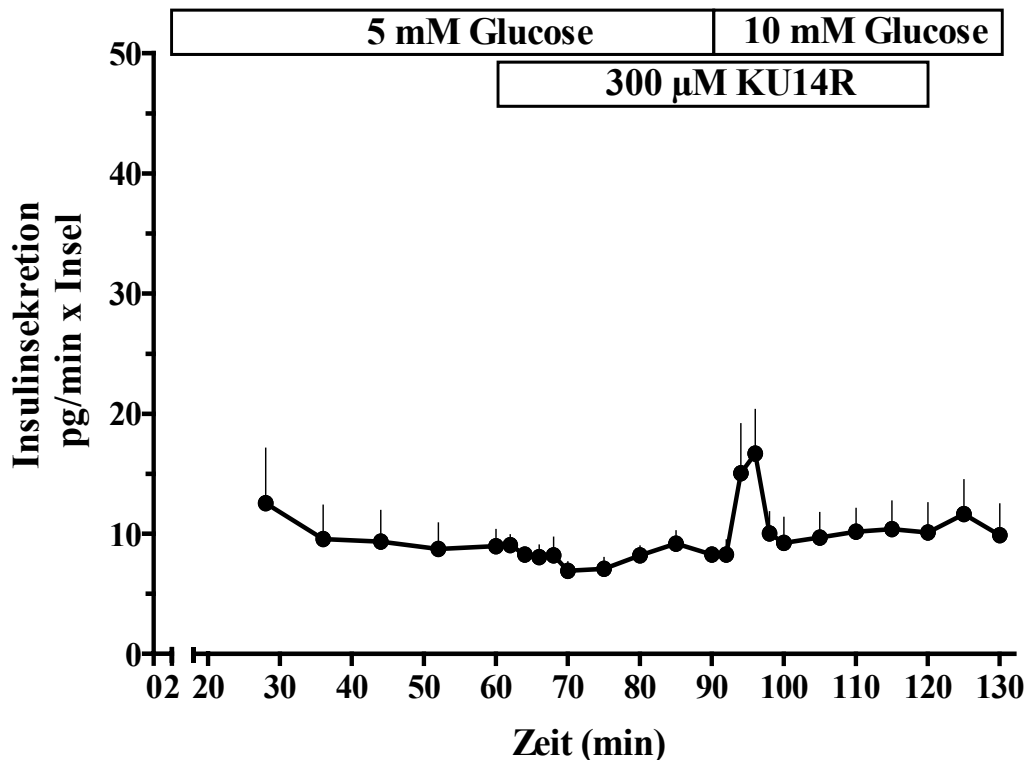


Abb. 5.8.: Wirkung von 300 μM KU14R auf die Insulinsekretion in Gegenwart von Glucose. Pankreasinseln der Maus wurden von Minute 0 bis 90 mit einer Krebs-Ringer-Lösung umströmt, die 5 mM Glucose enthielt. Ab Minute 60 wurde diesem Medium 300 μM KU14R zugesetzt. Die Glucosekonzentration wurde in der Minute 90 - bei fortdauernder Anwesenheit von 300 μM KU14R (bis Minute 120) - auf 10 mM erhöht (Minute 90 bis 130). Dargestellt ist Insulinsekretion in pg/min x Insel in Abhängigkeit von der Perifusionszeit in Minuten. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM aus 5 Einzelexperimenten.

Die einfachste Erklärung für die Diskrepanz zwischen Depolarisation und fehlendem Ca^{2+} -Anstieg ist, dass KU14R einen hemmenden Effekt auf spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ausübt. Dem jedoch steht die Beobachtung entgegen, dass eine Erhöhung der Glucosekonzentration die typischen oszillatorischen Ca^{2+} -Anstiege sowohl bei 100 μM KU14R als auch bei 300 μM KU14R bewirken kann. Hierfür ist das Öffnen von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen nämlich unabdingbar. Die Beobachtung, dass KU14R wesentlich weniger effektiv ist als Efaroxan, die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu erhöhen, liess sich auch bei einem direkten Vergleich bestätigen (Abb. 4.42.). Obwohl die gewählte Efaroxan-Konzentration deutlich weniger effektiv ist den K_{ATP} -Kanal zu hemmen als 300 μM KU14R, war der resultierende Ca^{2+} -Anstieg mehr als doppelt so hoch.

Die Beobachtung, dass KU14R weniger effektiv ist als Efaroxan, den Ca^{2+} -Anstieg an die Depolarisation zu koppeln, lässt die Möglichkeit zu, dass eine Konkurrenz dieser beiden Substanzen an einem gemeinsamen Wirkort zu einer Abschwächung des Efaroxan-induzierten Ca^{2+} -Anstiegs durch KU14R führt. Dies war jedoch nicht zu beobachten, im Gegenteil, die

durchschnittliche cytosolische Ca^{2+} -Konzentration lag bei gleichzeitiger Anwesenheit von KU14R und Efaroxan höher als bei Anwesenheit von Efaroxan alleine (Abb. 4.43.). Diese Beobachtung stimmt auch mit dem Sekretionsverhalten überein, wo KU14R die sekretionssteigernde Wirkung des Efaroxans nicht vermindert, sondern sogar eher leicht erhöhte (Bleck, 2006).

Die leichte Verminderung des durch die K^{+} -Depolarisation erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch KU14R legt nahe, dass es jedoch eine hemmende Wirkung von KU14R auf die Transporte zur Steigerung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gibt (Abb. 4.44.), insbesondere weil ein solcher Effekt mit Efaroxan nicht gefunden wurde (Abb. 4.45.). Da wie oben ausgeführt eine Wirkung auf spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle nicht wahrscheinlich ist, könnte eine Interferenz mit internen Speichern möglich sein. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass bereits das Imidazolin RX871024 eine Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen über Thapsigargin-sensitive Speicher induzieren soll (Efanov et al., 1998). Konkret würde das bedeuten, dass KU14R die Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen in interne Speicher aktivieren müsste. Durch Verwendung des Hemmstoffs der CaATPase Thapsigargin (Dyachok und Gylfe, 2001) war jedoch keine Steigerung des Effektes von KU14R auf die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ festzustellen.

Es bleibt des weiteren die Beobachtung zu erklären, warum der Effekt der K^{+} -Depolarisation durch KU14R vermindert werden konnte (Abb. 4.44.), nicht aber der Effekt der Efaroxan-induzierten Depolarisation (Abb. 4.43.).

Insgesamt wurde durch die Messung der Wirkung von Efaroxan und KU14R auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration der Bereich in der Stimulus-Sekretions-Kopplung definiert, in dem sich die Wirkung dieser beider Substanzen unterscheiden und der die unterschiedlichen Sekretionscharaktere erklärt. In Zusammenschau alle Ergebnisse zu Efaroxan und KU14R konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass es Wirkorte ausserhalb des K_{ATP} -Kanals gibt, die durch ein Imidazolin, nicht aber durch ein Imidazol beeinflusst werden.

5.5 Sind mikromolare Konzentrationen freier Fettsäuren Stimuli der Insulinsekretion mit Nährstoffcharakter („fuel secretagogues“) ?

Untersuchungen an Pankreasinseln der Maus hatten ergeben, dass die gesättigte Fettsäure Palmitat die Glucose-induzierte Insulinfreisetzung in Gegenwart stimulatorischer Glucosekonzentration verstärken konnte (Abb. 4.55.). Diesen Effekt konnten bereits schon Vara und Tamarit-Rodriguez (1986), Prentki et al. (1992) und Warnotte et al. (1994) beobachten, wobei die Experimente von Warnotte et al. mit einer höheren freien Palmitat-Konzentration

durchgeführt wurden. Wahrscheinlich erklärt dies auch, warum sich in dieser Publikation die Palmitat-Wirkung stärker darstellte. Wie in der Abbildung 4.56. dargestellt, konnte dieser Palmitat-induzierte Effekt durch 2-Bromopalmitat - einem Hemmstoff der Carnitin-Palmitoyl-transferase-1 (Remizov et al., 2003) - nicht antagonisiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die mitochondriale β -Oxidation der Fettsäuren keine Rolle bei der Palmitat-induzierten Sekretionsauslösung spielt, d.h. Palmitat kein Sekretionsauslöser mit Nährstoffcharakter darstellt. Das Ergebnis, dass die mangelnde Sekretionsverstärkung von 100 μ M Efaroxan in Gegenwart von 5 mM Glucose durch Palmitat nicht behoben werden konnte (Abb. 4.57.), entspricht dieser Schlussfolgerung, da Efaroxan selektiv nur die von Nährstoff-Stimuli ausgelöste Sekretion verstärkt (s. Kapitel 5.3.2). Chan et al. (2001b) hatten aus Sekretionsmessungen geschlossen, dass Efaroxan die Insulinsekretion sogar in Abwesenheit von Glucose initiieren könne, wenn durch Verstoffwechslung der gesättigten Fettsäure Palmitat Acyl-CoA zur Verfügung steht. Da aber in dieser Untersuchung nur mikromolare Palmitat-Konzentrationen verwendet worden sind, erscheinen diese Ergebnisse als unwahrscheinlich.

Untersuchungen des Einflusses von Substanzen auf die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität in Pankreasinseln ergaben, dass sich die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz durch 100 μ M Palmitat in Gegenwart von 10 mM Glucose um ca. 5 % reduzierte (Abb. 4.62.). Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Signalintensität der NAD(P)H-Fluoreszenz durch Glucose deutlich um ca. 14 % (Abb. 4.47.; Panten und Ishida, 1975). Damit bestätigt sich die Auffassung, dass 100 μ M Palmitat nicht als Nährstoff wirken. Fettsäuren sind geeignet, als Entkoppler der Atmungskette zu wirken (Rottenberg et al., 1990), ähnlich wie CCCP (Rustenbeck et al., 1997a), das den Glucose-induzierten Effekt auf die NAD(P)H-Fluoreszenzintensität um 20 % senken konnte (Abb. 4.51.). Hierdurch könnte der NAD(P)H-Abfall erklärt werden. Für eine sichere Beschreibung des entkoppelnden Effektes müsste aber eine Messung des Sauerstoffverbrauchs bezogen auf die ATP-Produktion durchgeführt werden. In dieser Hinsicht konnte 2-Bromopalmitat Palmitat nicht imitieren, es war ein Anstieg der NAD(P)H-Signalintensität zu beobachten (Abb. 4.63.).

Bezüglich des Mechanismus der insulinotropen Wirkung zeigte sich, dass sich die Amplituden der Glucose-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen im Cytosol nach Zusatz von 100 μ M Palmitat deutlich reduzierten (Abb. 4.58.), wohingegen die Arbeitsgruppe um Rorsman einen durch Palmitat induzierten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vermuteten (Olofsson et al., 2004). Das hier beschriebene Ergebnis ist insofern überraschend, da mittlerweile anerkannt ist, dass es Fettsäure-Rezeptoren gibt, die über Ca^{2+} -vermittelte Signalwege wirken. Diese nennt man

GPR40-Rezeptoren (Fujiwara et al., 2005; Salehi et al., 2005). Es stellt sich die Frage, wie die Diskrepanz zwischen der Palmitat-induzierten Verstärkung der Insulinsekretion in Gegenwart von 10 mM Glucose bei gleichzeitiger Verminderung der Amplituden der Ca^{2+} -Oszillationen im Cytosol zu erklären ist. Denkbar wäre, dass durch Palmitat keine Ca^{2+} -induzierte Exocytose der Sekretgranula ausgelöst wird, sondern die Freisetzung der Insulinsekretion auf anderen Mechanismen beruht. Solche könnten sein: 1.) Ein direkter Effekt auf die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher, der nicht nur durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure vermittelt wird (Hanstein, 1976). 2.) Ein Ca^{2+} -unabhängiger Effekt von Fettsäuren (vermutlich von ungesättigten FS) auf die Exozytose. Denkbar ist hier eine PKC-medierte Sekretion durch freie Fettsäuren (Metz, 1988; Jones et al., 2004).

6 Zusammenfassung

Es ist allgemein akzeptiert, dass der pharmakologisch induzierte Schluss des K_{ATP} -Kanals und die sich daran anschliessende Depolarisation der Plasmamembran der pankreatischen B-Zelle ein hinreichendes Signal für die Auslösung der Insulinsekretion ist, auch in Gegenwart basaler und sogar niedriger Glucosekonzentrationen. Einige Imidazoline, insbesondere Efaroxan, können den K_{ATP} -Kanal vollständig blockieren und auch eine Depolarisation bewirken, sind aber gleichzeitig in Gegenwart einer basalen Glucosekonzentration nicht in der Lage, die Insulinsekretion auszulösen. Erst nach Erhöhung der Glucosekonzentration auf stimulatorische Werte tritt eine verstärkende Wirkung der Imidazoline auf die Insulinsekretion zu Tage. Um die Ursache dieser Glucose-selektiven Insulinfreisetzung aufzuklären, wurden die Effekt des Imidazolins Efaroxan auf die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in Gegenwart von substimulatorischen und von gering stimulatorischen Glucosekonzentrationen in Pankreasinseln der Maus untersucht und mit denjenigen verglichen, die durch die Imidazoline RX871024, Phentolamin, Alindin und dem vermeintlichen Imidazolinantagonisten KU14R bewirkt werden, da der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ als der unmittelbare Auslöser der Insulinsekretion gilt. Als ratiometrischer Indikator für die $[Ca^{2+}]_i$ wurde Fura-2/AM verwendet, mit dem Einzelzellen und Pankreasinseln beladen wurden.

Obgleich durch Efaroxan die Insulinsekretion Glucose-selektiv stimuliert wurde, d.h. in Gegenwart einer substimulatorischen Glucosekonzentration (5 mM) die Sekretionauslösung ausblieb und bei einer gering stimulatorischen Glucosekonzentration (10 mM) deren Wirkung deutlich verstärkt wurde, steigerte Efaroxan die $[Ca^{2+}]_i$ bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose. Die $[Ca^{2+}]_i$ war nicht kontinuierlich erhöht, sondern wies Oszillationen mit einer Frequenz von ca. $0,14 \text{ min}^{-1}$ auf. Die Amplitude entsprach ungefähr dem steady state einer $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch eine K^+ -Depolarisation. Eine Erhöhung der Glucosekonzentration auf 10 mM in Gegenwart von Efaroxan bewirkte keine Erhöhung der Amplitude, sondern einen Anstieg der Frequenz auf $0,31 \text{ min}^{-1}$.

Auch Alindin, das ebenso wie Efaroxan die Insulinsekretion Glucose-selektiv steigerte, bewirkte bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose einen oszillatorischen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Von Phentolamin, Tolbutamid und einer hohen K^+ -Konzentration (40 mM) war hingegen bekannt, dass diese Substanzen die Insulinsekretion nicht Glucose-selektiv stimulierten. Diese

Zusammenfassung

Substanzen bewirkten einen langanhaltenden Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ohne oszillatorisches Muster. Der auffallend hohe Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ durch 100 μM RX 871024 liess sich durch eine Eigenfluoreszenz der Substanz erklären. Wurde diese durch Messungen mit scheinbeladenen Inseln korrigiert, so zeigten sich $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege mit Amplituden, die mit denen der anderen Imidazoline vergleichbar waren. Die Erhöhung der Glucosekonzentration von 5 mM auf 10 mM in Gegenwart eines der depolarisierenden Stimuli führte zu einem vorübergehenden Abfall der $[Ca^{2+}]_i$, der am ehesten als Ausdruck einer Aufnahme von Ca^{2+} in interne Speicher aufzufassen ist.

Angesichts des Befundes, daß die Glucoseselektivität ein konzentrationsabhängiges Phänomen ist, da mit 500 μM Efaroxan ein deutlicher Sekretionsanstieg bereits in Gegenwart von 5 mM Glucose zu beobachten war, stellte sich die Frage, ob dieser Änderung in den Sekretionscharakteristika eine Änderung des Effekts auf die $[Ca^{2+}]_i$ entsprach. In der Tat war mit der Erhöhung der Efaroxan-Konzentration von 100 μM auf 500 μM eine Überführung der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen in eine dauerhafte Erhöhung verbunden. Insofern könnte dem oszillatorischen Muster der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung eine entscheidende Rolle für die Glucoseselektivität der Imidazolin-induzierten Sekretionssteigerung zukommen.

Im Gegensatz zu 100 μM Efaroxan war eine K^+ -Depolarisation in der Lage, eine Insulinsekretionssteigerung bei basaler Glucosekonzentration zu bewirken. Wurde diese K^+ -Depolarisation in Anwesenheit von Efaroxan durchgeführt, so zeigte sich im Mittelwert der $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen ein vorübergehender Anstieg über das von Efaroxan bewirkte Mass hinaus. Dieser Anstieg entsprach dem initialen Überschuss des $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs, wie er typischerweise mit alleiniger K^+ -Depolarisation hervorgerufen wird. Möglicherweise werden durch die K^+ -Depolarisation Ca^{2+} -Ionen-Transportmechanismen aktiviert, die von 100 μM Efaroxan noch nicht aktiviert werden und die für die Sekretionsauslösung entscheidend sind.

Ähnlich wie mit Glucose zeigte sich auch bei Verwendung der Nährstoffstimuli α -Ketoisocapronsäure (KIC) und Glutamin, dass Efaroxan die Insulinsekretion erst nach Erhöhung der KIC-Konzentration auf einen gering stimulatorischen Werte (3 mM) verstärkte. In den entsprechenden Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ zeigte sich, daß Efaroxan bereits in Gegenwart von 1 mM KIC einen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration auslöst. Auch hier war ein oszillatorisches Muster zu beobachten, wobei die Frequenz $0,12 \text{ min}^{-1}$ betrug. Insofern bestehen Parallelen zu den Effekten in Gegenwart von Glucose. Auffallend war, dass die Reversibilität der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in Gegenwart von KIC und Glutamin schneller und

vollständiger war als in Gegenwart von Glucose. Insgesamt scheint die Glucoseselektivität des insulinotropen Effekts von Efaroxan Ausdruck einer allgemeinen Abhängigkeit von stimulatorischen Konzentrationen von Nährstoffstimuli der Insulinsekretion („fuel secretagogues“) zu sein.

Das Imidazol-Analogon von Efaroxan, KU14R, wurde als spezifischer Antagonist von insulinsekretionssteigernden Imidazolinen („I₃-Antagonist“) beschrieben und ist als solcher kommerziell erhältlich. Elektrophysiologische Messungen und Insulinsekretionsmessungen, die im Rahmen einer vorangeegangenen Dissertation durchgeführt worden waren, hatten jedoch keinen Antagonismus zwischen Efaroxan und KU14R belegen können. Hingegen hatte sich KU14R als effektiver Blocker des K_{ATP}-Kanals dargestellt. In den vorliegenden Untersuchungen bewirkte KU14R jedoch nur einen geringen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$, selbst in einer Konzentration, die den K_{ATP}-Kanal vollständig zu schliessen vermochte und eine starke Depolarisation der Plasmamembran bewirkte. Des weiteren war in den Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ kein Antagonismus zwischen Efaroxan und KU14R zu beobachten, wodurch die obigen Befunde erklärbar wurden. Nach dieser Datenlage kann i) KU14R nicht als Imidazolinantagonist bezeichnet werden und ii) die Imidazolinringstruktur als relevant für die Sekretionsauslösung an einem K_{ATP}-Kanal-unabhängigen Wirkort betrachtet werden.

In einigen Publikationen war beschrieben worden, dass K_{ATP}-Kanalöffner wie Diazoxid nicht in der Lage sind, den Imidazolin-induzierten Kanalschluss zu antagonisieren. In den vorliegenden Messungen der $[Ca^{2+}]_i$ als auch der Insulinsekretion konnte hingegen ein Antagonismus mit solchen Imidazolin beobachtet werden, deren Effekte schnell auswaschbar waren. Dieser Antagonismus war ebenso schnell und vollständig wie derjenige zwischen Tolbutamid und Diazoxid. In Gegenwart von Phentolamin oder Chinin war allerdings kein Antagonismus zu beobachten. Da elektrophysiologische Untersuchungen an inside-out Membranen und geöffneten Zellpräparationen auch für diese Substanzen einen Nukleosiddiphosphat- und Diazoxid-Antagonismus gezeigt haben, interpretieren wir diese Beobachtung dahingehend, dass Phentolamin und Chinin in intakten Zellen akkumulieren und dadurch nur mit sehr viel höheren Konzentrationen von Kanalöffner antagonisiert werden können.

Abschliessend wurde die Wirkung der Fettsäure Palmitat auf die Insulinsekretion, die $[Ca^{2+}]_i$ und die NAD(P)H-Konzentration in der Pankreasinsel charakterisiert, um die von anderen Autoren mitgeteilte Beobachtung zu prüfen, dass mikromolare Konzentrationen von

Zusammenfassung

Fettsäuren Glucose in seiner Rolle als „fuel secretagogue“ ersetzen können. Weder konnte unter diesen Bedingungen eine Efaroxan-induzierte Sekretionsverstärkung gesichert werden, noch gaben die anderen Messungen einen Hinweis darauf, dass Palmitat als „fuel secretagogue“ fungiert. Letztlich wird damit bestätigt, dass Efaroxan selektiv als Verstärker von „fuel secretagogues“ wirkt, nicht jedoch als Verstärker aller solchen Substanzen, die die $[Ca^{2+}]_i$ in B-Zellen zu erhöhen vermögen.

Zusammenfassend erscheint der Befund, dass der Depolarisations-induzierte $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg bei Imidazolinen nicht hinreichend ist, die Insulinsekretion zu erhöhen, am wichtigsten zu sein. Dadurch wird eine allgemein akzeptierte Annahme zum Ablauf der Stimulus-Sekretions-Kopplung in den B-Zellen in Frage gestellt. Am ehesten kann diese Diskrepanz zwischen dem $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg und dem fehlendem Sekretionsanstieg mit dem oszillatorischen Muster der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung in Verbindung gebracht werden. Ob durch die Oszillationen bestimmte für die Exozytose notwendige Ionenkanäle nicht in hinreichendem Ausmass geöffnet werden oder ob die Aktivierung von Exozytose-relevanten Kinasen erst mit gesteigertem Energiestoffwechsel zustande kommt, sind die in nachfolgenden Arbeiten zu prüfenden Hypothesen.

7 Literatur

- ÄMMÄLÄ C, ELIASSON L, BOKVIST K, BERGGREN PO, HONKANEN RE, SJÖHOLM A, RORSMAN P (1993): Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic β cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*: 4343-4347.
- AGUILAR-BRYAN L, NICHOLS CG, WECHSLER SW, CLEMENT JP IV, BOYD AE III, GONZALEZ G, HERRERA-SOSA H, NGUY K, BRYAN J, NELSON DA (1995): Cloning of the β -cell high-affinity sulfonylurea receptor: A regulator of insulin secretion. *Science* 268: 423-426.
- AHREN B, LUNDQUIST I (1985): Effects of α -adrenoceptor blockade by phentolamine on basal and stimulated insulin secretion in the mouse. *Acta Physiol Scand* 125: 211-217.
- AHREN B (1998): Glucagon-like peptide-1 (GLP-1): A gut hormone of potential interest in the treatment of diabetes. *Bio Essays* 20: 642-651.
- AINSCOW EK, RUTTER GA (2002): Glucose-stimulated oscillations in free cytosolic ATP concentration imaged in single islet B-cells. *Diabetes* 51 (Suppl. 1): S162-S170.
- ALBERTI KG, ZIMMET PZ (1998): Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* 15: 539-553.
- ANDREU E, SORIA B, SANCHEZ-ANDRES JV (1997): Oscillations of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol* 498: 753-761.
- ARKHAMMAR POG, TERRY BR, KOFOD H, THASTRUP O (1998): Pancreatic islets cultured on extracellular matrix: An excellent preparation for microfluorometry. *Methods Cell Sci* 19: 255-268.
- ASHCROFT SJ, RANDLE PJ (1968): Control of insulin release by glucose. *Proc R Soc Med* 61: 814-815.
- ASHCROFT SJ, WEERASINGHE LC, RANDLE PJ (1973): Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem J* 132: 223-31.
- ASHCROFT FM, HARRISON DE, ASHCROFT SJH (1984): Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic B-cells. *Nature* 312: 446-448.
- ASHCROFT FM, ASHCROFT SJH, HARRISON DE (1987): Effects of 2-ketoisocaproate on insulin release and single potassium channel activity in dispersed rat pancreatic β -cells. *J Physiol* 385: 517-529.
- ASHCROFT FM, RORSMAN P (1989): Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog Biophys Mol Biol* 54: 87-143.
- ASHCROFT SJH, ASHCROFT FM (1990): Properties and functions of ATP-sensitive K^+ channels. *Cell Signal* 2: 197-214.

- ASHCROFT FM, GRIBBLE FM (1999): ATP-sensitive K^+ channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 42: 903-919.
- ATWATER I, MEARS D, ROJAS E (1996): Electrophysiology of the pancreatic B-cell. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*; hrsg v LeRoith D, Taylor SI; Lippincott, Philadelphia; pp 79-102.
- BALL AJ, FLATT PR, MCCLENAGHAN N (2000): Stimulation of insulin secretion in clonal BRIN-DB11 cells by the imidazoline derivatives KU14R and RX801080. *Pharmacol Res* 42: 575-579.
- BARG S (2003): Mechanism of exocytosis in insulin-secreting B-cells and glucagon-secreting A-cells. *Pharmacol Toxicol* 92: 3-13.
- BEAUVOIS MC, ARREDOUANI A, JONAS JC, ROLLAND JF, SCHUIT F, HENQUIN JC, GILON P (2004): Atypical Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from a sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase-dependent Ca^{2+} -Pool in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* 559: 141-156.
- BERGSTEN P, GRAPENGIESSER E, GYLFE E, TENGHOLM A, HELLMAN B (1994): Synchronous oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} and insulin release in glucose-stimulated pancreatic islets. *J Biol Chem* 269: 8749-8753.
- BERTRAM R, SHERMAN A (2004): Filtering of calcium transients by the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biophys* 87: 3775-3785.
- BERTS A, BALL A, DRYSELIUS S, GYLFE E, HELLMAN B (1996): Glucose stimulation of Somatostatin-producing islet cells involves oscillatory Ca^{2+} signaling. *Endocrinology* 137: 693-697.
- BEST L (1997): Glucose and α -ketoisocaproate induce transient inward currents in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia* 40: 1-6.
- BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2004): Glucose dependence of imidazoline-induced insulin secretion. *Diabetes* 53 (Suppl. 3): S135-S139.
- BLECK C, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I (2005): Essential role of the imidazoline moiety in the insulinotropic effect but not the K_{ATP} channel blocking effect of imidazolines; a comparison of the effects of efaroxan and its imidazole analogue, KU14R. *Diabetologia* 48: 2567-2575.
- BLECK C (2006): Untersuchungen zu Mechanismen der glucoseselektiven Steigerung der Insulinsekretion durch Imidazoline. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- BODEN G (1997): Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 46: 3-10.
- BOKVIST K, RORSMAN P, SMITH PA (1990): Block of ATP-regulated and Ca^{2+} -activated K^+ channels in mouse pancreatic β -cells by external tetraethylammonium and quinine. *J Physiol* 423: 327-342.
- BOULTON AJ (2000): The diabetic foot: a global view. *Diabetes Metab Res Rev* 16 (Suppl. 1): S2-S5.

- BROADSTONE VL, PFEIFFER MA, BAJAJ V, STAGNER JI, SAMOLS E (1987): Alpha-adrenergic blockade improves glucose-potentiated insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 36: 932-937.
- BYRNE MM, STURIS J, O'MEARA NM, POLONSKY KS (1996): Insulin secretion in humans: physiologic regulation and alternation in disease states. In: *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*; hrsg. v. LeRoith D, Taylor SI; Lippincott, Philadelphia; pp 3-11.
- CAHILL GF JR (1988): Beta-cell deficiency, insulin resistance, or both ? *N Engl J Med* 318: 1268-1270.
- CHAN SLF, MORGAN NG (1990): Stimulation on insulin secretion by Efaroxan may involve interaction with potassium channels. *Eur J Pharmacol* 176: 97-101.
- CHAN SLF, DUNNE MJ, STILLINGS M, MORGAN NG (1991): The α_2 -adrenoceptor antagonist Efaroxan modulates K_{ATP} channels in insulin-secreting cells. *Eur J Pharmacol* 204: 41-48.
- CHAN SLF, BROWN A, MORGAN NG (1993): Stimulation of insulin secretion by the imidazoline α_2 -adrenoceptor antagonist Efaroxan is mediated by a novel stereoselective, binding site. *Eur J Pharmacol* 230: 375-378.
- CHAN SLF, BROWN CA, SCARPELLO KE, MORGAN NG (1994): The imidazoline site involved in control of insulin secretion: characteristics that distinguish it from I1- and I2-sites. *Br J Pharmacol* 112: 1065-1070.
- CHAN SLF, ATLAS D, JAMES RFL, MORGAN NG (1997): The effect of the putative endogenous imidazoline receptor ligand clonidine-displacing substance on insulin secretion from rat and human islets. *Br J Pharmacol* 112: 1065-1070.
- CHAN SLF, PALETT AL, CLEWS CA, RAMSDEN A, CHAPMAN JC, KANE C, DUNNE MJ, MORGAN NG (1998): Characterization of new Efaroxan derivates for use in purification of imidazoline-binding sites. *Eur J Pharmacol* 355: 67-76.
- CHAN SLF, MOURTADA M, MORGAN NG (2001a): Characterization of a K_{ATP} channel-independent pathway involved in potentiation of insulin secretion by Efaroxan. *Diabetes* 50: 340-347.
- CHAN SLF, FORRESTER D, MORGAN NG (2001b): Fatty AcylCoA esters are required for the imidazoline insulin secretagogues Efaroxan to initiate insulin secretion. *Diabetologia* 44 (Suppl) (Abstract): A 135.
- CLEMENT JP IV, KUNJILWAR K, GONZALEZ G, SCHWANSTECHE M, PANTEN U, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (1997): Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron* 18: 827-838.
- COOK DL, HALES CN (1984): Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311: 271-273.
- COORE HG, RANDLE PJ (1964): Regulation of insulin secretion with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. *Biochem J* 93 : 66-78.

- COUPRY I, PODEVIN RA, DAUSSE JP, PARINI A (1987): Evidence for imidazoline binding sites in basolateral membranes from rabbit kidney. *Biochem Biophys Res Commun* 147: 1055-1060.
- CREUTZFELDT W (2001): The entero-insular axis in type 2 diabetes – incretins as therapeutic agents. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (Suppl. 2): S288-S303.
- DEAN PM, MATTHEWS AEK (1968): Electrical activity in pancreatic islet cells: effect of ions. *Nature* 219: 389-390.
- DETIMARY P, GILON P, NENQUIN M, HENQUIN JC (1994): Two sites of glucose control of insulin release with distinct dependence on the energy state in pancreatic β -cells. *Biochem J* 297: 455-461.
- DUNNE MJ, PETERSEN OH (1991): Potassium-selective ion channels in insulin-secreting cells: physiology, pharmacology and their role in stimulus-secretion coupling. *Biochem Biophys Acta* 1071: 67-82.
- DUNNE MJ, HARDING EA, JAGGAR JH, SQUIRES PE (1994): Ion channels and the molecular control of insulin secretion. *Biochem Soc Trans* 22: 6-12.
- DYACHOK O, GYLFE E (2001): Store-operated influx of Ca^{2+} in pancreatic B-cells exhibits graded dependence on the filling of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 114: 2179-2186.
- DYACHOK O, GYLFE E (2004): Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release via Inositol(1,4,5)-trisphosphate receptors is amplified by protein kinase A and triggers exocytosis in pancreatic B-cells. *J Biol Chem* 279: 45455-45461.
- DYACHOK O, ISAKOV Y, SAGETORP J, TENGHOLM A (2006): Oscillations of cAMP in hormone-stimulated insulin-secreting B-cells. *Nature* 439: 349-352.
- EFANOV IB, ZAITSEV SV, BROWN G, BERGGREN PO, EFENDIC S (1998): RX871024 induces Ca^{2+} -mobilization from thapsigargin-sensitive stores in mouse pancreatic β -cells. *Diabetes* 47: 211-218.
- EFANOV AM, ZAITSEV SV, MEST HJ, RAAP A, APPELSSKOG IB, LARSSON O, BERGGREN PO, EFENDIC S (2001): The novel imidazoline compound BL11282 potentiates glucose-induced insulin secretion in pancreatic β -cells in the absence of modulation of K_{ATP} channel activity. *Diabetes* 50: 797-802.
- EFANOV AM, APPELSSKOG IB, ABDEL-HALIM SM, KHAN A, BRÄNSTRÖM R, LARSSON O, ÖSTENSON CG, MEST HJ, BERGGREN PO, EFENDIC SE, ZAITSEV SV (2002): Insulinotropic activity of the imidazoline derivative RX871024 in the diabetic GK rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: 117-124.
- EFENDIC S, EFANOV AM, BERGGREN PO, ZAITSEV SV (2002): Two generations of insulinotropic imidazoline compounds. *Diabetes* 51 (Suppl. 3): S448-S454.
- ERNSBERGER PR, MEELEY MP, MANN JJ, REIS DJ (1987): Clonidine binds to imidazole binding sites as well as α_2 -adrenoceptors in the ventrolateral medulla. *Eur J Pharmacol* 134: 1-13.

- EXPERT COMMITTEE (2003): Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 26 (Suppl. 3): S5-S20.
- FERNANDEZ J, VALDEOLMILLOS M (2000): Synchronous glucose-dependent $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans recorded in vivo. *FEBS Lett* 477: 33-36.
- FERNER R, NEIL H (1988): Sulfonylureas and hypoglycaemia. *Br Med J* 296: 949-950.
- FERANNINI E (1998): Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocr Rev* 19: 477- 490.
- FÖLSCH UR, LEMBCKE B (1991): Inhibition der intestinalen Alpha-Glukosidasen in der Therapie des Diabetes mellitus. *Internist* 32: 699-707.
- FUHLENDORFF J, RORSMAN P, KOFOD H, BRAND CL, ROLIN B, MACKAY P, SHYMKO R, CARR RD (1998): Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. *Diabetes* 47: 345-351.
- FUJITA T, SETO Y, KONDO N, KATO R (1996): Studies on the N-[(trans-4-isopropyl-cyclohexyl)-carbonyl]-D-phenylalanine (A-4166) receptor in HIT T-15 cells. *Biochem Pharmacol* 52: 407-411.
- FUJIWARA K, MAEKAWA F, YADA T (2005): Oleic acid interacts with GPR40 to induce Ca^{2+} signaling in rat islet beta-cells: mediation by PLC and L-Type Ca^{2+} channel and link to insulin release. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: 670-677.
- GEMBAL M, GILON P, HENQUIN JC (1992): Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K^+ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 89: 1288-1295.
- GEMBAL M, DETIMARY P, GILON P, GAO ZY, HENQUIN JC (1993): Mechanisms by which glucose can control insulin release independently from its action on adenosine triphosphate-sensitive K^+ channels in mouse B cells. *J Clin Invest* 91: 871- 880.
- GERICH JE (1998): The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev* 19: 491-503.
- GERMAN MS (1993): Glucose sensing in the pancreatic islet beta cells: The key role of glucokinase and the glycolytic intermediates. *Proc Nat Acad Sci* 50: 1781-1785.
- GILON P, HENQUIN JC (1992): Influence of membrane potential changes on cytoplasmic Ca^{2+} concentration in an electrically excitable cell, the insulin-secreting pancreatic β -cell. *J Biol Chem* 267: 20713-20720.
- GILON P, JONAS JC, HENQUIN JC (1994): Culture duration and conditions affect the oscillations of cytoplasmic calcium concentration induced by glucose in mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 37: 1007-1014.
- GILON P, ARREDOUANI A, GAILLY P, GROMADA J, HENQUIN JC (1999): Uptake and release of Ca^{2+} by the endoplasmic reticulum contribute to the oscillations of the cytosolic Ca^{2+} concentration triggered by Ca^{2+} influx in the electrically excitable pancreatic B-cell. *J Biol Chem* 274: 20197-20205.

- GILON P, RAVIER MA, JONAS JC, HENQUIN JC (2002): Control mechanisms of the oscillations of insulin secretion in vitro and in vivo. *Diabetes* 51 (Suppl.1): S144-S151.
- GORUS FK, SCHUIT FC, IN'T VELD PA, GEPTS W, PIPELEERS DG (1988): Interaction of sulfonylureas with pancreatic β -cells. *Diabetes* 37: 1090-1095.
- GOTOH M, MAKI T, KIYOIZUMI T, SATOMI S, MONACO AP (1985): An improved method for isolation of mouse pancreatic islets. *Transplantation* 40: 437- 438.
- GREGORIO F, AMBROSI F, CRISTALLINI S, PEDETTI M, FILIPPONI P, SANTEUSANIO F (1992): Therapeutical concentrations of tolbutamide, glibenclamide, glicazide and gliquidone at different glucose levels: in vitro effects on pancreatic α - and β - cell function. *Diabetes Res Clin Pract* 18: 197-206.
- GRIBBLE F, DAVIS TME, HIGHAM C, CLARK A, ASHCROFT FM (2000): The antimalarial agent mefloquine inhibits ATP-sensitive K^+ channels. *Br J Pharmacol* 131: 756 - 760.
- GROMADA J, BOKVIST K, DING WG, BORG S, BUSCHARD K, RENSTRÖM E, RORSMAN P (1997): Adrenaline stimulates glucagon secretion in pancreatic α -cells by increasing the Ca^{2+} current and the number of granules close to the L-type Ca^{2+} channels. *J Gen Physiol* 110: 217-228.
- GROMADA J, BROCK B, SCHMITZ O, RORSMAN P (2004): Glucagon-Like Peptide-1: Regulation of insulin secretion and therapeutic potential. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95: 252-262.
- GROOP LC (1992): Sulfonylureas in NIDDM (Review). *Diabetes Care* 15: 737-757.
- GROSSE LACKMANN T, ZÜNKLER BJ, RUSTENBECK I (2003): Specificity of nonadrenergic imidazoline binding sites in insulin-secreting cells and relation to the block of ATP-sensitive K^+ channels. *Ann NY Acad Sci* 1009: 371-377.
- GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEN RY (1985): A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- HANSTEIN WG (1976): Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 456: 129-148.
- HASSELBLATT A, POLZIN C, SCHWANSTECHE C, SCHWANSTECHE M (1992): Effects of the imidazoline compound phentolamine and of sulphonylureas on insulin releasing cells, a comparative study. *Fundam Clin Pharmacol* 6 (Abstract).
- HASTEDT K (2003): Mechanismus der K_{ATP} -Kanal-unabhängigen Wirkung beta-zytotroper Nährstoffe und Interaktion neuer Sulfonylharnstoff-Analoga mit K_{ATP} -Kanälen. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- HAUNER H (1998): Verbreitung des Diabetes mellitus in Deutschland. *Dtsch Med Wschr* 123: 777-782.
- HEISSIG H, URBAN KA, HASTEDT K, ZÜNKLER BJ, PANTEN U (2005): Mechanism of the insulin-releasing action of alpha-ketoisocaproate and related alpha-ketoacid anions. *Mol Pharmacol* 68: 1097-1105.

- HELLER G, GUNSTER C, SCHELLSCHMIDT H (2004): Wie häufig sind Diabetes-bedingte Amputationen unterer Extremitäten in Deutschland? *Dtsch Med Wschr* 129: 429-433.
- HELLMAN B, GYLFE E, GRAPENGIESSER E, LUND PE, BERTS A (1992): Cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Acta* 1113: 295-305.
- HENQUIN JC (1982): Quinine and the stimulus-secretion coupling in pancreatic beta-cells: glucose-like effects on potassium permeability and insulin release. *Endocrinology* 110: 1325-1332.
- HENQUIN JC, MEISSNER HP (1984): Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cells. *Experientia* 40: 1043-1052.
- HENQUIN JC (1987): Regulation of insulin release by ionic and electrical events in β -cells. *Hormone Res* 27: 168-178.
- HENQUIN JC, JONAS JC, GILON P (1998): Functional significance of Ca^{2+} oscillations in pancreatic β -cells. *Diabetes Metab* 24: 30-36.
- HENQUIN JC (2000): Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49: 1751-1760.
- HOLST JJ (2002): Therapy of type 2 diabetes mellitus based on the actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 430-441.
- HOLZ GG, LEECH CA, HELLER RS, CASTONGUAY M, HABENER JF (1999): cAMP-dependent mobilization of intracellular Ca^{2+} stores by activation of Ryanodine receptors in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 274: 14147-14156.
- HOLZ GG (2004): Epac: A new cAMP-binding protein in support of Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic β -cell. *Diabetes* 53: 5-13.
- IKENOUE T, OKAZAKI K, FUJITANI S, TSUCHIYA Y, AKIYOSHI M, TOSHIO M, KONDO N (1997): Effect of a new hypoglycaemic agent, A-4166 [(-)-N-(trans-4-isopropylcyclohexanecarbonyl)-D-phenylalanine], on postprandial blood glucose excursion: comparison with voglibose and glibenclamide. *Biol Pharm Bull* 20: 354-359.
- JANKA HU, REDAELLI M, GANDJOUR A, GIANI G, HAUNER H, MICHAELIS D, STANDL E (2000): Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG*; hrsg. v. Scherbaum WA, Lauterbach KW, Renner R, Deutsche Diabetes-Gesellschaft, Düsseldorf; 1. Aufl., pp 13-30.
- JAKOB I, HAUSER IA, THEVENOD F, LINDEMANN B (1998): MDR1 in taste buds of rat vallate papilla: functional, immunohistochemical and biochemical evidence. *Am J Physiol Cell Physiol* 274: C182-C191.
- JING X, LI DQ, OLOFSSON CS, SALEHI A, SURVE VV, CABALLERO J, IVARSSON R, LUNDQUIST I, PEREVERZEV A, SCHNEIDER T, RORSMAN P, RENSTRÖM E (2005): $\text{Ca}_v2.3$ calcium channels control second-phase insulin release. *J Clin Invest* 115: 146-154.

- JONAS JC, PLANT TD, HENQUIN JC (1992): Imidazoline antagonists of α_2 -adrenoceptors increase insulin release in vitro by inhibiting ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol* 107: 8-14.
- JONAS JC, PLANT TD, ANGEL I, LANGER SZ, HENQUIN JC (1994): In vivo stimulation of insulin release by SL840418, a new α_2 -adrenoceptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 254: 72-33.
- JONES PM, BURNS CJ, BELIN VD, RODERIGO-MILNE HM, PERSAUD SJ (2004) : The role of cytosolic phospholipase A_2 in insulin secretion. *Diabetes* 53 (Suppl. 1): S172-S178.
- JONKERS FC, JONAS JC, GILON P, HENQUIN JC (1999): Influence of cell number on the characteristics and synchrony of Ca^{2+} oscillations in clusters of mouse pancreatic islet cells. *Journal of Physiology* 520: 839-849.
- KANG G, HOLZ GG (2002): Amplification of exocytosis by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in INS-1 pancreatic B-cells. *J Physiol* 546: 175-189.
- KARAM JH, SANZ E, SALOMON E, NOLTE MS (1986): Selective unresponsiveness of pancreas β -cells to acute sulfonylurea stimulation during sulfonylurea therapy in NIDDM. *Diabetes* 35: 1314-1320.
- KASTEN FH (1993): Introduction to fluorescent probes: properties, history and applications. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis*; hrsg. v. Mason WT; San Diego, Academic Press, pp 12-31.
- KAWAKI J, NAGASHIMA K, TANAKA J, TAKASHI M, MIYAZAKI M, GONOI T, MITSUHASHI N, NAKAJIAMA N, IWANAGA T, YANO H, SEINO S (1999): Unresponsiveness to glibenclamide during chronic treatment induced by regulation of ATP-sensitive K^+ channel activity. *Diabetes* 48: 2001-2006.
- KENNEDY RT, KAURI LM, DAHLGREN GM, JUNG SK (2002): Metabolic oscillations in β -cells. *Diabetes* 51 (Suppl. 1): S152-S161.
- KIKUCHI M (1996): Modulation of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus by two novel oral hypoglycaemic agents, NN623 and A4166. *Diabet Med* 13 (Suppl. 6): S151-S155.
- KJEMS LL, RAVIER MA, JONAS JC, HENQUIN JC (2002): Do oscillations of insulin secretion occur in the absence of cytoplasmic Ca^{2+} oscillations in β -cells. *Diabetes* 51 (Suppl. 1), S177-S182.
- KOMATSU M, SCHERMERHORN T, NODA M, STRAUB SG, AIZAWA T, SHARP GWG (1997): Augmentation of insulin release by glucose in the absence of extracellular Ca^{2+} : new insights into stimulus-secretion coupling. *Diabetes* 46: 1928-1938.
- LACY PE, KOSTIANOVSKY M (1967): Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16: 35-39.
- LEFEBVRE PJ, PAOLISSO G, SCHEEN AJ, HENQUIN JC (1987): Pulsatility of insulin and glucagon release: physiological significance and pharmacological implications. *Diabetologia* 30: 443-452.

- LEHMANN JM, MOORE LB, SMITH-OLIVER TA, WILKISON WO, WILLSON TM, KLIEWER SA (1995): An antidiabetic thiazolidinedione as a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 270: 12953-12956.
- LEMBERT N, IDAHL LÅ (1998): α -Ketoisocaproate is not a true substrate for ATP production by pancreatic β -cell mitochondria. *Diabetes* 47: 339-344.
- LEMMENS R, LARSSON O, BERGGREN PO, ISLAM S (2001): Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from the endoplasmatic reticulum amplifies the Ca^{2+} signal mediated by activation of voltage-gated L-type Ca^{2+} channels in pancreatic β -cells. *J Biol Chem* 276: 9971-9977.
- LENZEN S (1979): Insulin secretion by isolated perfused rat and mouse pancreas. *Am J Physiol* 236: 391-400.
- LENZEN S, PANTEN U (1981): Effects of pyruvate, L-lactate, and 3-phenylpyruvate on function of ob/ob mouse pancreatic islets: insulin secretion in relation to $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake and metabolism. *Biochem Med* 25: 366-372.
- LENZEN S, SCHMIDT W, RUSTENBECK I, PANTEN U (1986): 2-Ketoglutarate generation in pancreatic β -cell mitochondria regulates insulin secretory action of amino acids and 2-keto acids. *Biosci Reports* 6: 163-169.
- LENZEN S, PANTEN U (1988): Signal recognition by pancreatic B-cells. *Biochem Pharmacol* 37: 371-378.
- LENZEN S, LERCH M, PECKMANN T, TIEDGE M (2000): Differential regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets by glucose, α -ketoisocaproic acid, glyceraldehyde and glycolytic intermediates. *Biochim Biophys Acta* 1523: 65-72.
- LENZEN S, PECKMANN T (2001): Effects of tolbutamide and N-benzoyl-D-phenylalanine (NBDP) on the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets. *Biochem Pharmacol* 62: 923-928.
- LERNMARK A (1974): The preparation of and studies on free cell suspensions from mouse pancreatic islets. *Diabetologia* 10: 431-438.
- LIU Y, TENGHOLM A, GRAPENGIESSER E, HELLMAN B, GYLFE E (1998): Origin of slow and fast oscillations of Ca^{2+} in mouse pancreatic islets. *J Physiol* 508: 471-481.
- MACDONALD MJ, FAHIEN LA (2000): Glutamate is not a messenger in insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 34025-34027.
- MACDONALD PE, EL-KHOLY W, RIEDEL MJ, SALAPATEK AMF, LIGHT PE, WHEELER MB, (2002): The multiple actions of GLP-1 on the process of glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes* 51 (Suppl. 3): S434-S442.
- MAECHLER P, WOLLHEIM CB (1999): Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature* 402: 685-689.
- MALAISSÉ WJ, MALAISSÉ-LAGAE F, MAYHEW DA, WRIGHT PH (1967): Effects of sulfonyl-ureas upon insulin secretion by the rat's pancreas. In: *Tolbutamide after ten years*; hrsg. v. Butterfield WJH, Westering W, Experta Medica, Amsterdam; pp 49-60.

- MALAISSIE WJ (1996): Metabolic signaling of insulin secretion. *Diabetes Res* 4: 145-159.
- MANZINI I, SCHILD D (2002): Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *J Physiol* 546: 375-385.
- MARTY A, NEHER E (1983): Tight-seal whole cell recording. In: *Single-Channel Recording*; hrsg. v. Sackmann B, Neher E, Plenum, New York; pp 107-122.
- MATSCHINSKY FM (1996): A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes* 45: 223-241.
- MATTHEWS EK (1970): Calcium and Hormone Release. In: *Calcium and Cellular function*, hrsg. v. Cuthbert AW, London, Macmillan; pp 163-182.
- MATTHEWS EK (1985): Electrophysiology of pancreatic islets β -cells. In: *The electrophysiology of the secretory cell*; hrsg. v. Poisner AM, Trifaro JM; Elsevier, Amsterdam; pp 93-112.
- MAYER G, TABERNER PV (2002): Effects of the imidazoline ligands Efaroan and KU14R on blood glucose homeostasis in the mouse. *Eur J Pharmacol* 454: 95-102.
- MEARS D, SHEPPARD NF JR, ATWATER I, ROJAS E (1995): Magnitude and modulation of pancreatic beta-cell gap junction electrical conductance in situ. *J Membr Biol* 146: 163-176.
- MEARS D (2004): Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca^{2+} channels. *J Membrane Biol* 200: 57-66.
- MEGLASSON MD, MATSCHINSKY FM (1986): Pancreatic islet glucose metabolism and regulation of insulin secretion. *Diabet Metab Rev* 2: 163-214.
- MEISSNER HP (1976): Electrophysiological evidence for coupling between β -cells of pancreatic islets. *Nature* 262: 502-504.
- METZ SA (1988): Perspectives in diabetes. Is protein kinase C required for physiology insulin release ? *Diabetes* 37: 3-7.
- MICHEL MC, ERNSBERGER PR (1992): Keeping an eye on the I site: imidazoline-preferring receptors. *Trends Pharmacol Sci* 13: 369-370.
- MIURA Y, HENQUIN JC, GILON P (1997): Emptying of intracellular Ca^{2+} stores stimulates Ca^{2+} entry in mouse pancreatic β -cells by both direct and indirect mechanism. *J Physiol* 503: 387-398.
- MONKS LK, COSGROVE KE, DUNNE MJ, RAMSDEN CA, MORGAN NG, CHAN SL (1999): Affinity isolation of imidazoline binding proteins from rat brain using 5-amino-efaroan as a ligand. *FEBS Lett* 19: 61-64.
- MORGAN NG, CHAN SLF, LACEY RJ, BROWN CA (1994): Pharmacology and molecular biology of islet cell adrenoceptors. In: *Frontiers of insulin secretion and pancreatic β -cell research*; hrsg. v. Flatt P, Lenzen S, Smith-Gordon, London; pp 359-368.

- MORGAN NG, PALLETT AL, MOURTADA M, CHAN SLF, CLEWS J, RAMSDEN CA (1996): Synthesis and characterisation of KU14R a novel antagonist of the pancreatic islet imidazoline binding site. *Diabetologia* 39 (Suppl.1) (Abstract): A121.
- MOSKALEWSKI S (1965): Isolation and culture of the islets of Langerhans of the guinea pig. *Gen comp Endocr* 5: 342-353.
- MOURTADA M, SMITH SA, MORGAN NG (1998): Effector systems involved in the insulin secretory responses to efaroxan and RX871024 in rat islets of Langerhans. *Eur J Pharmacol* 350: 251-258.
- MUDALIAR S, HENRY RR (2001): New oral therapies for type 2 diabetes mellitus: the glitazones or insulin sensitizers. *Annu Rev Med* 52: 239-257.
- NADAL A, VALDEOLMILLOS M, SORIA B (1994): $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by tolbutamide in single pancreatic islets. In: *Insulin secretion and pancreatic B-cell research; hrsg. v. Flatt Ed PR, Lenzen S, Smith-Gordon, London; pp* 237-241.
- NADAL A, QUESADA I, SORIA B (1999): Homologous and heterologous asynchronicity between identified α -, β - and γ -cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517: 85-93.
- NICHOLS CG, LOPATIN AN (1997): Inward Rectifier Potassium Channels. *Annu Rev Physiol* 59: 171-191.
- NIELSEN LL, YOUNG AA, PARKES DG (2004): Pharmacology of exenatide (synthetic exendin-4): a potential therapeutics for improved glycemic control of type 2 diabetes. *Regul Pept* 117: 77-88.
- NUNEMAKER CS, ZHANG M, WASSERMANN DH, MCGUINNESS OP, POWERS AC, BERTRAM R, SHERMAN A, SATIN LS (2005): Individual mice can be distinguished by the period of their islet calcium oscillations: is there an intrinsic islet period that is imprinted in vivo ? *Diabetes* 54: 3517-3522.
- OLOFSSON CS, SALEHI A, HOLM C, RORSMAN P (2004): Palmitate increases L-type Ca^{2+} currents and the size of the readily releasable granule pool in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol* 557: 935-948.
- ÖSTENSON CG, PIGON J, DOXEY JC, EFENDIC S (1988): α_2 -adrenoceptor blockade does not enhance glucose-induced insulin release in normal subjects or patients with non insulin-dependent diabetes. *J CR Endocrinol Metab* 67: 1054-1059.
- PANTEN U, v. KRIEGSTEIN E, POSER W, SCHÖNBORN J, HASSELBLATT A (1972): Effects of L-leucine and α -ketoisocaproic acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *FEBS Lett* 20: 225-228.
- PANTEN U (1975): Effects of alpha-ketomonocarboxylic acids upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 291: 405-420.
- PANTEN U, ISHIDA H (1975): Fluorescence of oxidized flavoproteins from perfused isolated pancreatic islets. *Diabetologia* 11: 569-573.

- PANTEN U, ISHIDA H, SCHAUDER P, FRERICHs H, HASSELBLATT A (1977): A versatile micro-perfusion system. *Analyt Biochem* 82: 317-326.
- PANTEN U, LANGER J (1981): Mechanism of 3-phenylpyruvate-induced insulin release from isolated pancreatic islets. *Biochem J* 198: 353-356.
- PANTEN U (1987): Rapid control of insulin secretion from pancreatic islets. *ISI Atlas Sci Pharmacol* 1: 307-310.
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, WALLASCH A, LENZEN S (1988): Glucose both inhibits and stimulates insulin secretion from isolated pancreatic islets exposed to maximally effective concentrations of sulfonylureas. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 338: 459-462.
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, SCHWANSTECHER C (1992): Pancreatic and extrapancreatic sulfonylurea receptors. *Horm Metabol Res* 24: 549-554.
- PANTEN U, SCHWANSTECHER M, SCHWANSTECHER C (1996): Mode of action of sulfonylureas. In: *Handbook of experimental pharmacology 119, Oral antidiabetics*; hrsg. v. Kuhlmann J, Puls W, Springer-Verlag, Berlin; pp 129-159.
- PANTEN U, RUSTENBECK I (2005): Pharmakologie des Glucosestoffwechsels. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, hrsg. V. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, Verlag Urban & Fischer, München, 9. Aufl.: Kap. 27, pp 617-637.
- PIPELEERS D, IN'T VELD P, MAES E, VAN DE WINKEL M (1982): Glucose-induced insulin release depends on functional cooperation between islet cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 7322-7325.
- PLANT TD, HENQUIN JC (1990): Phentolamine and yohimbine inhibit ATP-sensitive K⁺-channels in mouse pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol* 101: 115-120.
- PLANT TD, JONAS JC, HENQUIN JC (1991): Clonidine inhibits ATP-sensitive K⁺channels in mouse pancreatic β -cells. *Br J Pharmacol* 101: 115-120.
- PLOEM JS (1993): Fluorescence microscopy. In: *Fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analysis*. hrsg. v. Mason WT, San Diego, Academic Press, pp 1-11.
- POLONSKY KS, GIVEN BD, HIRSCH LJ, TILLIL H, SHAPIRO ET, BEEBE C, FRANK BH, GALLOWAY JA, VAN CAUTER E (1988): Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 318: 1231-1239.
- PORKSEN N, HOLLINGDAL M, JUHL C, BUTLER P, VELDHUIS JD, SCHMITZ O (2002): Pulsatile insulin secretion: detection, regulation and role in diabetes. *Diabetes* 51 (Suppl. 1): S245-S254.
- PRAXISLEITLINIEN DER DEUTSCHEN DIABETES-GESELLSCHAFT (DDG) (2002). *Diabetes und Stoffwechsel*, Band 11, (Suppl. 2), hrsg. v. Scherbaum WA, Landgraf R.

- PRENTKI M, VISCHER S, GLENNON MC, REGAZZI R, DEENEY JT, CORKEY BE (1992): Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* 267: 5802-5810.
- PROKS P, ASHCROFT FM (1997): Phentolamine block of K_{ATP} channels is mediated by Kir6.2. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11716-11720.
- QUESADA I, NADAL A, SORIA B (1999): Different effects of Tolbutamide and Diazoxide in α -, β - and γ -cells within intact islets of Langerhans. *Diabetes* 48: 2390-2397.
- QUESADA I, MARTIN F, SORIS B (2000): Nutrient modulation of polarized and sustained submembrane Ca²⁺ microgradients in mouse pancreatic islet cells. *J Physiol* 525: 159-167.
- RAVIER MA, GILON P, HENQUIN JC (1999): Oscillations of insulin secretion can be triggered by imposed oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ or metabolism in normal mouse islets. *Diabetes* 48: 2374-2382.
- RAVIER MA, SEHLIN J, HENQUIN JC (2002): Disorganization of cytoplasmic Ca²⁺ oscillations and pulsatile insulin secretion in islets from ob/ob mice. *Diabetologia* 45: 1154-1163.
- RAVIER MA, GÜLDENAGEL M, CHAROLLAIS A, GJINOVCI A, CAILLE D, SÖHL G, WOLLHEIM CB, WILLECKE K, HENQUIN JC, MEDA P (2005): Loss of Connexin36 alters β -cell coupling islet synchronization of Glucose-induced Ca²⁺ and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes* 54: 1798-1807.
- REMIZOV O, JAKUBOV R, DÜFER M, KRIPPEIT DREWS P, DREWS G, WARING M, BRABANT G, WIENBERGEN A, RUSTENBECK I, SCHÖFL C (2003): Palmitate-induced Ca²⁺ signaling in pancreatic beta-cells. *Mol Cell Endocrinol* 212: 1-9.
- ROBERTSON RP, PORTE D (1973): Adrenergic modulation of basal insulin secretion in man. *Diabetes* 22: 1-8.
- RORSMAN P, ASHCROFT FM, TRUBE G (1988): Single Ca²⁺ channel currents in mouse pancreatic B-cells. *Pflugers Arch* 412: 597-603.
- RORSMAN P, RENSTRÖM E (1999): Glutamate primes the pump. *Nature* 402: 595-596.
- ROTTENBERG H (1990): Decoupling of oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1018: 1-17.
- RUSTENBECK I, HERRMANN C, GRIMMSMANN T (1997a): Energetic requirement of insulin secretion distal to calcium influx. *Diabetes* 46: 1305-1311.
- RUSTENBECK I, HERRMANN C, RATZKA P, HASSELBLATT A (1997b): Imidazoline/guanidinium binding sites and their relation to inhibition of K_{ATP} channels in pancreatic β -cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 410-417.
- RUSTENBECK I, KÖPP M, POLZIN C, HASSELBLATT A (1998): No evidence for PKC activation in insulin secretion by phentolamine. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358, 390-393.

- RUSTENBECK I (1999a): Die Stimulus-Sekretions-Kopplung in den B-Zellen des Pankreas: Von der Physiologie zur Pharmakologie. *Diabetes und Stoffwechsel* 8: 217-222.
- RUSTENBECK I, LEUPOLT L, KOWALEWSKI R, HASSELBLATT A (1999b): Heterogeneous characteristics of imidazoline-induced insulin secretion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 359: 235-242.
- RUSTENBECK I, WINKLER M, JÖRNS A (2001a): Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide and quinine. I. Secretory and morphological studies. *Biochem Pharmacol* 62: 1685-1694.
- RUSTENBECK I, DICKEL C, GRIMMSMANN T (2001b): Desensitization of insulin secretory response to imidazolines, tolbutamide and quinine. II. Electrophysiological and fluorimetric studies. *Biochem Pharmacol* 62: 1695-1703.
- SALEHI A, FLODGRÉN E, NILSSON NE, JIMENEZ-FELTSTROM J, MIYAZAKI J, OWMAN C, OLDE B (2005): Free fatty acid receptor (FFA(1)R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res* 322: 207-215.
- SALTIEL AR (2001): New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* 104: 517-529.
- SAMOLS E, WEIR GC (1979): Adrenergic Modulation of Pancreatic A, B and D Cells. *J Clin Invest* 63: 230-238.
- SATIN LS, COOK DL (1985): Voltaged-gated inward currents in pancreatic islet β -cells. *Pflügers Arch* 404: 385-387.
- SATO Y, AIZAWA T, KOMATSU M, OKADA N, YAMADA T (1992): Dual functional role of membrane depolarization/ Ca^{2+} influx in rat pancreatic B-cell. *Diabetes* 41: 438-443.
- SATO Y, HENQUIN JC (1998): The $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$ channel independent pathway of regulation of insulin secretion by glucose. In search of the underlying mechanism. *Diabetes* 47: 1713-1721.
- SCHMELING H (2004): Direkte Hemmung ATP-sensitiver Kaliumkanäle in der pankreatischen B-Zelle durch Monocarbonsäuren. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- SCHUIT FC, HUYPENS P, HEIMBERG H, PIPELEERS DG (2001): Glucose sensing in pancreatic B-cells. *Diabetes* 50: 1-11.
- SCHULZ A, HASSELBLATT A (1988): Phentolamine, a deceptive tool to investigate sympathetic nervous control of insulin release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 337: 637-643.
- SCHULZ A, HASSELBLATT A (1989a): An insulin-releasing property of imidazoline derivatives is not limited to compounds that block α -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 321-327.
- SCHULZ A, HASSELBLATT A (1989b): Dual action of clonidine on insulin release: suppression, but stimulation when α_2 -adrenoceptors are blocked. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340: 712-714.

- SCHULZ M (2005): Untersuchungen zur Interaktion aktivierender und inhibitorischer Nukleotide bei der Regulation von SUR1/Kir6.2-Kanälen. *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig.
- SEGHERS V, NAKAZAKI M, DEMAYO F, AGUILAR-BRYAN L, BRYAN J (2000): SUR1 knockout mice: a model for K_{ATP} channel-independent regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 275: 9270-9277.
- SENER A, MALAISSE WJ (1980): L-Leucine and a non-metabolized analogue activate pancreatic islet glutamate dehydrogenase. *Nature* 288: 187-189.
- SPEIER S, YANG SB, SROKA K, ROSE T, RUPNIK M (2005): K_{ATP} channels in beta-cells in tissue slices are directly modulated by millimolar ATP. *Mol Cell Endocrinol* 230:51-58.
- SPIEGELMAMN BM (1998): PPAR γ : Adipogenic Regulator and Thiazolidinedione Receptors, *Diabetes* 47: 507-514.
- STRAUP SG, SHARP GWG (2002): Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* 18: 451- 463.
- STUMVOLL M, HÄRING HU (2002): Glitazones: clinical effects and molecular mechanisms. *Ann Med* 34: 217-224.
- STURGESS NC, ASHFORD MLJ, COOK DL, HALES CN (1985): The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive K⁺ channel. *Lancet* 2: 474-475.
- TAGUCHI N, AIZAWA T, SATO Y, ISHIHARA F, HASHZUME K (1995): Mechanism of glucose-induced biphasic insulin release: physiological role of adenosine triphosphate-sensitive K⁺ channel-independent glucose action. *Endocrinology* 136: 3942-3948.
- THORENS B, SARKAR HK, KABACK HR, LODISH HF (1988): Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney and beta-pancreatic islet cells. *Cell* 55: 281-290.
- TRONIER B, MARBURY TC, DAMSBO P, WINDFELD K (1995): A new oral hypoglycaemic agent, repaglinide, minimises risk of hypoglycaemia in well-controlled NIDDM patients. *Diabetologia* 38 (Suppl. 1) (Abstract): A195.
- TRUBE G, RORSMAN P, OHNO-SHOSAKU T (1986): Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺-channel in mouse pancreatic B-cell. *Pflügers Arch* 407: 493-499.
- TURNER RC, HARRIS E, OUNSTED E, PONSFORD C (1979): Two abnormalities of glucose-induced insulin secretion: Dose response characteristics and insulin sensitivity. *Acta Endocrinol* 92: 148-165.
- TURNER RC, CULL CA, FRIGHI V, HOLMAN RR (1999): Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKDS 49). *J Am Med Ass* 281: 2005-2012.
- ULLRICH S, WOLLHEIM CB (1984): Islet cyclic AMP levels are not lowered during alpha 2-adrenergic inhibition of insulin release. *J Biol Chem* 259: 4111-4115.

- VALDEOLMILLOS M, NADAL A, SORIA B, GARCIA-SANCHO J (1993): Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42: 1210-1214.
- VARA E, TAMARIT-RODRIGUEZ J (1986): Glucose stimulation of insulin secretion in islets of fed and starved rats and its dependence on lipid metabolism. *Metab Clin Exp* 35: 266-271.
- WARNOTTE C, GILON P, NENQUIN M, HENQUIN JC (1994): Mechanisms of the stimulation of insulin release by saturated fatty acids. *Diabetes* 43: 703-711.
- WOLFFENBUTTEL BH (1999): Repaglinide: a new compound for the treatment of patients with type 2 diabetes. *Neth J Med* 55: 229-234.
- WOLLEN N, BAILEY CJ (1988): Inhibition of hepatic gluconeogenesis by metformin. Synergism with insulin. *Biochem Pharmacol* 37: 4353-4358.
- YAMADA S, KOMATSU M, SATO Y, YAMAUCHI K, AIZAWA T, HASHIZUME K (2001): Glutamate is not a major conveyer of ATP-sensitive K^+ channel-independent glucose action in pancreatic islet β cell. *Endocr J* 48: 391-395.
- YANG SN, BERGGREN PO (2005): $Ca_v2.3$ channel and PKC α : new players in insulin secretion. *J Clin Invest* 115: 16-20.
- YOUNG AA, GEDULIN BR, BHAVSAR S, BODKIN N, JODKA C, HANSEN B, DENARO M (1999): Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (ob/ob, db/db) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48: 1026-1034.
- ZAITSEV SV, EFANOV AM, EFANOVA IB, LARSSON O, ÖSTENSON CG, GOLD G, BERGGREN PO, EFENDIC S (1996): Imidazoline compounds stimulate insulin release by inhibition of K_{ATP} channels and interaction with exocytotic machinery. *Diabetes* 45: 1610-1618.
- ZAITSEV SV, EFANOV AM, RAAP A, EFANOVA IB, SCHLOOS J, STECKEL-HAMANN B, LARSSON O, ÖSTENSON CG, BERGGREN PO, MEST HJ, EFENDIC S (1999): Different modes of action of imidazoline compound RX871024 in pancreatic β -cell: blocking of K^+ channels, mobilization of Ca^{2+} from endoplasmatic reticulum and interaction with exocytotic machinery. *Ann N Y Acad Sci* 881: 241-253.
- ZIMMET P, ALBERTI KGMM, SHAW J (2001): Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414: 782-787.
- ZIMNY S, GOGOLIN F, ABEL J, GLEICHMANN H (1993): Metallothionein in isolated pancreatic islets of mice: induction by zinc and streptozotocin, a naturally occurring diabetogen. *Arch Toxicol* 67: 61-65.

8 Abkürzungen

Abb. = Abbildung

ADA = American Diabetes Association

ADP = Adenosin-5'-phosphat

AM = Acetoxymethyl-

A_{\max} = Anregungswellenlänge

ATP = Adenosin-5'-triphosphat

Aqua bidest. = bidestilliertes Wasser

bidest. = bidestilliert

BP = Bandpassfilter

BSA = bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)

bzw. = beziehungsweise

ca. = circa

cAMP = zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat

$[Ca^{2+}]_i$ = intrazelluläre Calciumionenkonzentration

CBS = chromatic beam splitter

CCCP = Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon

CCD = charge coupled devices

CPA = Cyclopiazonicsäure

CPT1 = Carnitin Palmitoyl Transferase 1

DAG = Diacylglycerol

d.h. = das heisst

DMSO = Dimethylsulfoxid

E = Einheit

ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay

E_{\max} = Emissionswellenlänge

ER = endoplasmatisches Retikulum

etc. = et cetera

F = Fluoreszenzen

Fa. = Firma

FADH₂ = Flavin-Adenin-Dinukleotid

FCS = Fötales Kälberserum

g = Gramm

GDP = Guanosin-5'-diphosphat

Abkürzungen

GTP = Guanosin-5'-triphosphat

h = Stunde

HbA1c = glykiertes Hämoglobin

HE = Hämatoxylin-Eosin

HEPES = [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure

hrsg. = herausgegeben

I = Insulin enthaltendes Vesikel

insbes. = insbesondere

IP₃ = Inositoltrisphosphat

IR = Infrarot-Spektroskopie

Kap. = Kapitel

K_{ATP}-Kanal = ATP-sensitiver Kaliumkanal

KC = α -Ketocaprinsäure

K_D = Dissoziationskonstante

KIC = α -Ketoisocaprinsäure

K_{IR} = einwärtsgerichteter Kaliumkanal

K_M = Michaelis-Konstante

KR = Krebs-Ringer

l = Liter

LP = Langpassfilter

M = mol/l

mm = millimeter

mg = milligramm

MG = relative Molmasse [g/mol]

ml = milliliter

M_r = relative Molekülmasse

min = Minute

mM = millimolar (10^{-3} mol/Liter)

N = Normal

NAD(P)H = Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

μ m = Mikrometer

μ M = mikromolar (10^{-6} mol/Liter)

μ l = Mikroliter (10^{-6} l)

n = Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente

NBF = nucleotide binding fold (Nukleotid-bindende Region)

Abkürzungen

nm = nanometer

NMRI = Naval medical research institute (USA)

PE = Polyethylen-

PKA/PKC = Proteinkinase A/C

PP = Pankreatisches Polypeptid

ROI = region of interest

RYR = Ryanodinrezeptor

sec = Sekunde

s. / s.o.= siehe / siehe oben

SEM = Standardabweichung des Mittelwertes

sog. = so genannt

Suppl. = Supplement

SUR = Sulfonylurea receptor (Sulfonylharnstoff-Rezeptor)

Tab. = Tabelle

TK = Teilerkante

U = Umdrehungen

u.a. = unter anderem

v.a. = vor allem

VDCC = voltage-dependent calcium channel

vergl. = vergleiche

z.B. = zum Beispiel

z.T. = zum Teil